

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom- Biologin Bernadett Müller

aus: Leinefelde

Tag der mündlichen Prüfung:

**Die Rolle der NK-Zellen in der
Zytokin-vermittelten Pathogenese
der rheumatoiden Arthritis**

Gutachter: Prof. Dr. Stephan Urban (Erstgutachter)
Prof. Dr. Christine Falk (Zweitgutachter)

Inhalt

Inhalt

Abkürzungen

| | |
|--|----|
| A Zusammenfassung | 1 |
| B Einleitung | 5 |
| 1 Das Immunsystem | 5 |
| 1.1 Natürliche Killer-Zellen | 7 |
| 1.1.1 NK-Zell-Rezeptoren | 11 |
| 1.1.2 NK-Zell-Subpopulationen | 15 |
| 1.1.3 NK-Zellen im Kontext autoimmuner Gelenkerkrankungen | 17 |
| 1.2 T-Lymphozyten | 18 |
| 1.3 T-Zellen im Kontext autoimmuner Gelenkerkrankungen | 19 |
| 2 Das humane CD6 Rezeptormolekül | 20 |
| 3 Kommunikation im Immunsystem | 21 |
| 3.1 Zytokine | 22 |
| 3.2 Chemokine und Migration | 24 |
| 4 Autoimmune und nicht-autoimmune Gelenkerkrankungen | 27 |
| 4.1 Rheumatoide Arthritis | 28 |
| 4.2 Arthrose | 29 |
| 5 Aufgabenstellung | 31 |
| C Material | 33 |
| 1 Geräte | 33 |
| 2 Chemikalien | 33 |
| 3 Verbrauchsmaterial | 34 |
| 3.1 Zellkultur | 34 |
| 3.2 Multiplex-Analysen | 36 |
| 3.3 Zellmigrations-Versuch | 36 |
| 3.4 Molekularbiologie | 36 |
| 3.5 Allgemein | 37 |
| 4 Zellen | 38 |
| 4.1 Zelllinien | 38 |
| 5 Blut- und Synovialflüssigkeitsproben | 38 |
| 5.1 Arthritis-Patienten | 38 |
| 5.2 Arthrose-Patienten | 39 |
| 5.3 Normalspender | 40 |
| 6 Antikörper | 40 |
| 6.1 Primärantikörper | 41 |
| 6.2 Sekundärantikörper | 42 |
| 7 Firmenverzeichnis | 42 |
| 8 Kooperationspartner | 43 |
| D Methoden | 45 |
| 1 Allgemeine Methoden der Zellkultur | 45 |
| 1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen | 45 |
| 1.2 Bestimmung der Zellzahl | 45 |
| 1.3 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC) | 46 |
| 1.3.1 Ficoll-Separation | 46 |
| 1.3.2 Hypotone Lyse der Erythrozyten | 46 |
| 1.4 Isolierung der mononukleären Zellen aus Synovialflüssigkeit (SFMC) | 46 |
| 1.5 Isolierung der mononukleären Zellen aus Synovialgewebe | 47 |
| 1.6 Separierung von NK- und T-Zellen aus PBMC | 47 |
| 1.6.1 Separation mit Dynabeads® | 47 |

| | | |
|----------|--|----|
| 1.6.2 | Separation mit der MACS Technologie | 48 |
| 1.7 | Kultivierung von adhärenenten und Suspensions-Zellen | 48 |
| 1.8 | Kultivierung von PBMC bzw. NK-Zellen | 48 |
| 1.9 | Rezeptorstimulation mit Plattengebundenen Antikörpern | 48 |
| 2 | Durchflusszytometrie | 49 |
| 2.1 | Allgemein | 49 |
| 2.2 | Direkte Färbung | 50 |
| 2.3 | Chemokinrezeptor-Färbung | 50 |
| 2.4 | Indirekte Färbung | 50 |
| 2.5 | Zellstimulation mit PMA/Ionomycin und intrazelluläre Färbung | 51 |
| 2.6 | Messung und Auswertung | 51 |
| 3 | Messung der Zytotoxizität von T- und NK-Zellen | 52 |
| 3.1 | CD107a-Degranulations-Versuch | 52 |
| 3.1.1 | Degranulations-Versuch mit Zielzellen | 52 |
| 3.1.2 | Degranulations-Versuch mit plattengebundenen Antikörpern | 53 |
| 4 | Molekularbiologische Methoden | 53 |
| 4.1 | RNS-Isolierung | 53 |
| 4.2 | Reverse Transkription | 53 |
| 4.3 | PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) | 53 |
| 4.4 | Gelelektrophorese | 55 |
| 4.5 | Isolierung von DNS aus Agarosegel | 55 |
| 5 | Multiplex-Analysen | 55 |
| 5.1 | Allgemein | 55 |
| 5.2 | Zytokinbestimmung | 56 |
| 5.3 | Messung und Auswertung | 57 |
| 6 | ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) | 57 |
| 7 | Analyse der Migration von peripheren mononukleären Zellen | 57 |
| 8 | Statistik | 58 |
| E | Ergebnisse | 59 |
| 1 | Phänotyp und funktionelle Relevanz peripherer NK- und T-Zellen im Hinblick auf die CD6 Expression | 59 |
| 1.1 | CD6 und CD16 Expression auf humanen peripheren NK- und T-Zellen | 59 |
| 1.2 | Expression verschiedener aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf peripheren NK- und T-Zellen | 62 |
| 1.3 | Expression der CD6Δd3-Splicevariante in der Leukämiezelllinie NKL und in primären NK-Zellen | 65 |
| 1.4 | Darstellung der Degranulationsfähigkeit von NK- und T-Zellen im Hinblick auf die CD6 Expression | 68 |
| 1.4.1 | Einfluss der ALCAM-Expression HLA-Klasse-I negative Tumorzellen auf das Degranulationsverhalten von NK- und T-Zellen | 68 |
| 1.4.2 | Degranulation von NK- und T-Zellen in Anwesenheit von HLA-Klasse-I negativen Zielzellen | 69 |
| 1.4.3 | Degranulation von NK- und T-Zellen nach direkte CD6 Rezeptorstimulation | 72 |
| 1.5 | Zytokin- und Chemokinfreisetzung von NK- und T-Zellen nach Rezeptorstimulation | 76 |
| 1.5.1 | Zytokin- und Chemokinfreisetzung von NK-Zellen nach CD6-Stimulation | 76 |
| 1.5.2 | Kinetik der Zytokin- und Chemokinfreisetzung | 78 |
| 1.6 | Intrazelluläre Chemokinproduktion von NK-Zellen und T-Zellen | 80 |
| 1.6.1 | Freisetzung von IFN γ , TNF α und CXCL10 | 80 |
| 1.6.2 | Die Freisetzung von IL-17 und IL-22 in NK- und T-Zellen | 82 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 2 | NK- und T-Zellen im Kontext autoimmuner und nicht-autoimmuner Gelenkerkrankungen | 87 |
| 2.1 | Phänotyp von NK- und T-Zellen in der Peripherie und Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose | 88 |
| 2.1.1 | CD6 und CD16 Expression auf peripheren und synovialen NK- und T-Zellen von Patienten mit Arthritis und Arthrose | 88 |
| 2.1.2 | Detaillierter Phänotyp der peripheren und synovialen NK- und T-Zellen von Patienten mit Arthritis und Arthrose | 92 |
| 2.2 | Verteilung der CD56dim und CD56bright NK-Zellen in der Synovialmembran von Patienten mit Arthrose | 95 |
| 2.3 | Rezeptorvermittelte Chemokin- und Zytokinproduktion von synovialen mononukleären Zellen | 97 |
| 2.4 | IL-17 und IL-22 Produktion von synovialen mononukleären Zellen | 101 |
| 2.5 | Zytokinmuster in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zum Plasma der rheumatoiden Arthritis- und Arthrose-Patienten | 104 |
| 2.6 | Chemokin-vermittelte Migration von NK- und T-Zellen im Hinblick auf autoimmune und nicht-autoimmune Gelenkerkrankungen | 108 |
| 2.6.1 | Chemokinrezeptorexpression auf peripheren NK- und T-Zell-Subpopulationen eines gesunden Spenders | 108 |
| 2.6.2 | Chemokinmuster in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zum Plasma der rheumatoiden Arthritis- und Arthrose-Patienten | 111 |
| 2.6.3 | Migrationsverhalten der CD56dim und CD56bright NK-Zell-Populationen auf chemotaktische Lockstoffe | 113 |
| F | Diskussion | 115 |
| 1 | Relevanz der CD6 Expression auf die Funktion peripherer NK- und T-Zellen | 115 |
| 2 | NK- und T-Zellen im Kontext autoimmuner und nicht-autoimmuner Gelenkerkrankungen | 119 |
| 2.1 | Die selektive Infiltration von CD6-CD56bright NK-Zellen in die Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten | 119 |
| 2.2 | Differenzielle Zytokin/Chemokin-Muster in der Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten | 125 |
| 2.3 | Der Einfluss von NK- und T-Zellen an der Aufrechterhaltung des inflammatorischen Milieus in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten | 129 |
| 2.4 | IL-17 und IL-22 produzierende NK-Zellen | 131 |
| G | Literatur | 133 |
| H | Anhang | 143 |
| I | Danksagung | 150 |

Abkürzungen

| | |
|--------------------|---|
| Δ | Delta |
| \varnothing | Durchmesser |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grad Celsius |
| Ca^{2+} | Kalzium |
| μl | Mikroliter |
| aNKR | aktivierender NK-Rezeptor |
| ADCC | antikörpervermittelte Zytotoxizität; <i>engl.: antibody dependent cellular</i> |
| APC | Allophycocyanin, Antigen präsentierende Zelle |
| APZ | antigenpräsentierende Zelle |
| AS | Aminosäure |
| bp | Basenpaar |
| bzgl. | bezüglich |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | ungefähr |
| CCR/L | α Chemokin Familie (R=Rezeptor, L=Ligand) |
| CXCR/L | β Chemokin Familie (R=Rezeptor, L=Ligand) |
| CD | Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>) |
| cDNS | Zur mRNS komplementäre (<i>complementary</i>) DNS |
| CML | Chromfreisetzungstest (<i>cell mediated lympholysis</i>) |
| DC | Dendritische Zellen (<i>engl.: dendritic cells</i>) |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Didesoxy-Nukleotid-tri-Phosphat |
| E:Z (E:T) | Effektor-zu-Zielzell-Ratio (<i>effector cell to target cell ratio</i>) |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| EDTA | Di-Natriummethylen-diamintetraacetat |
| FACS | fluoreszenzaktiviertes Zellsortiergerät (Durchflußzytometer) |
| FBS | fötales Rinderserum |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FSC | Vorwärts-Streulicht (<i>forward scatter</i>) |
| g | g-Beschleunigung |
| g | Gramm |
| HLA | humane Leukozytenantigene |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| iNKR | Inhibierender Rezeptor |
| insg. | insgesamt |
| ITAM | Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes aktivierendes Motiv |
| ITIM | Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes inhibierendes Motiv |
| kb | Kilobasenpaar |
| kD | kiloDalton |
| KIR | Killerzell Immunglobulin-Rezeptor (<i>killer cell immunglobulin receptor</i>) |
| KKF | Kleine Zellkulturflasche (TC25) |
| LRC | Leukozyten-Rezeptor-Komplex (<i>leucoyte receptor complex</i>) |
| mAk | monoklonale Antikörper |
| mg | Milligramm |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>) |
| MKF | Mittlere Zellkulturflasche (TC75) |
| mRNS | Boten-RNS (<i>messenger-RNS</i>) |
| n | Anzahl der Versuche |
| nm | Nanometer |
| NCR | Natürlicher Zytotoxizitäts-Rezeptor (<i>natural cytotoxicity receptor</i>) |

| | |
|-----------------------|---|
| NK | Natürliche Killerzelle |
| NS | Normal Spender |
| p | Signifikanzwert |
| PA | Polyarthritis |
| PBMC | Periphere Blut-mononukleäre Zellen |
| PBS | Phosphatgepufferte Saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein |
| pg/ml | pikogramm/milliliter |
| pH | Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| PHA | Phytohämagglutinin (Lektin) |
| PMA | Phorbol-12-Myristat 13-Acetat |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| ReA | Reaktive Arthritis |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| RPMI | Medium (<i>Rosewell Park Memorial Institut</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| SA-PE | Streptavidin-PE |
| PI | Plasma |
| Se | Serum |
| SF | Synovialflüssigkeit |
| SFMC | synoviale mononukleäre Zellen |
| SRCR | Cysteinreicher Scavengerrezeptor |
| SSC | Seitwärts-Streulicht (<i>side scatter</i>) |
| SD | Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>) |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| T _H -Zelle | T-Helfer-Zelle |
| TM | Tumormedium |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TZR | T-Zellrezeptor |
| U | Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>) |
| u.a. | unter anderem |
| UV-Licht | Ultraviolettes Licht |
| vgl. | Vergleich |
| z. B. | zum Beispiel |
| ZTL | zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>) |

A. Zusammenfassung

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus unterschiedlichen Zellen, Molekülen und Organen, die durch ein ebenso komplexes Netzwerk an Mediatoren wie den Zytokinen und Chemokinen verbunden sind. Bei Autoimmunkrankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis, gerät dieses streng kontrollierte Netzwerk außer Kontrolle und die Immunzellen beginnen, körpereigene Strukturen zu zerstören. Neben autoaggressiven T- und B-Zellen, deren Wirken im Kontext der rheumatoiden Arthritis in vielen Untersuchungen beschrieben wurden, stellen die weniger untersuchten NK-Zellen aufgrund ihrer Fähigkeit, Zytokine in großen Mengen freizusetzen, eine in der Entstehung und Aufrechterhaltung von autoimmunen Prozessen ebenso wichtige Zellpopulation dar. Periphere NK-Zellen werden anhand der Expression ihrer Oberflächenmoleküle CD56 und CD16 als $CD56^{dim}CD16^{+}$ und $CD56^{bright}CD16^{+}$ definiert. Funktionell besitzen NK-Zellen, wie T-Zellen, die Fähigkeit sowohl Zytokine und Chemokine zu sekretieren und zytotoxisch entartete Zellen zu eliminieren. Neben CD56 und CD16 wurde im ersten Teil dieser Arbeit CD6 als neuer differenzieller Marker auf NK-Zellen untersucht. Ursprünglich auf T-Zellen beschrieben, zeigt sich, dass CD6 ebenfalls auf der Mehrheit der peripheren $CD56^{dim}$ NK-Zellen exprimiert ist. Anhand der CD56/CD16/CD6 Expression lassen sich periphere NK-Zellen von gesunden Spendern in die drei Subpopulationen $CD56^{dim}CD6^{+}$, $CD56^{dim}CD6^{-}$ und $CD56^{bright}CD6^{-}$ einteilen, wobei in der Peripherie die $CD56^{dim}CD6^{+}$ -Fraktion gegenüber den anderen signifikant dominiert. Im Hinblick auf die Funktion von CD6 auf den $CD56^{dim}$ NK-Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine direkte Stimulation von CD6 keine Degranulation, aber die Sekretion von Zytokinen ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und IL-17) und Chemokinen (CXCL12, CXCL8, CXCL10, CXCL1) auslöst. Die CD6 Expression auf NK-Zellen beschreibt damit eine $CD56^{dim}$ Subpopulation, die mit einem unterschiedlichen Zytokin/Chemokin Muster korreliert.

Da NK-Zellen über Zytokine/Chemokine oder den direkten Kontakt mit Immunzellen (z.B. Dendritischen Zellen oder T-Zellen) die Immunantwort steuern können, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit ihre Rolle in der rheumatoiden Arthritis, einer autoimmunen Gelenkerkrankung, bei der proinflammatorische Zytokine maßgeblich am Entstehungsprozess beteiligt sind, untersucht. Im Vergleich zu peripherem Blut zeigt sich in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthritis und Arthrose, einer nicht autoimmunen Gelenkerkrankung, die hier als Kontrollgruppe diente, eine umgekehrte Verteilung der NK-Zell-Subpopulationen, hin zu einer Anreicherung der $CD56^{bright}CD16^{-}CD6^{-}$ NK-Zellen. Durch die Analyse weiterer NK-Zell-Marker (NKp46, NKp30, NKG2A/CD94, NKG2D) konnte die selektive Anreicherung dieser Subpopulation bestätigt werden. Von allen untersuchten Markern korrelierte die Abwesenheit von CD6 jedoch am stärksten mit der $CD56^{bright}CD16^{-}CD6^{-}$ Infiltration.

Die NK-Subpopulationen unterscheiden sich ebenfalls in ihrem Chemokinrezeptor-Repertoire, wonach CD56^{bright} NK-Zellen exklusiv CXCR3, den Chemokinrezeptor für CXCL10 (IP-10) und CXCL9 (MIG), exprimieren, wohingegen CD56^{dim} NK-Zellen hauptsächlich CXCR1 und CXCR2, die Rezeptoren für CXCL8 (IL-8) und CXCL1 (GRO α), exprimieren. Die Analyse der Chemokine in den SF und Plasmen von Arthritis und Arthrose-Patienten zeigte, dass in der SF der Patienten die CD56^{bright} anlockenden Chemokine (CXCL10 und CXCL9), welche an einer selektive Rekrutierung dieser Zellen beteiligt sein könnten, signifikant erhöht vorliegen. Jedoch liegen in den SF ebenfalls Chemokine (CXCL8 und CXCL1) vor, welche eher CD56^{dim} NK-Zellen rekrutieren. Die Abwesenheit der CD56^{dim}CD16⁺CD6⁺ NK-Zellen in der SF der Patienten konnte daher nicht mit der Abwesenheit der rekrutierenden Chemokine beantwortet werden, so dass andere Mechanismen daran beteiligt sein müssen.

Neben den Chemokinen wurden in dieser Arbeit auch die Zytokine in den SF und Plasmen beider Patientengruppen untersucht. Dabei zeigt sich, dass die Th1 (IFN γ , IL-2, TNF α , TNF β), Th2 (IL-4, IL-10, IL-13, GM-CSF) und die TH17 (IL-17, IL-22) Zytokine, an deren Produktion NK-Zellen sowie T-Zellen beteiligt sind, ausschließlich in den SF/Plasmen der autoimmunen Arthritis-, nicht jedoch der nicht-autoimmunen Arthrose-Patienten, signifikant erhöht vorliegen. Damit konnte in dieser Arbeit eine deutliche Trennung zwischen den beiden gelenkdestruktiven Erkrankungen, anhand des Zytokinmusters, vollzogen werden, wobei die autoimmune Entzündung in der Arthritis durch ihre Th1/Th17-Immunantwort zur schlussendlichen Gelenkzerstörung führt. Im Gegensatz dazu wird dieselbe pathologische Endstrecke, die Gelenkzerstörung, in der Arthritis durch eine nicht autoimmune Entzündung erreicht.

Daher lassen sich aus diesen Ergebnissen zukünftig eventuelle Strategien für eine Differentialdiagnose zur Abgrenzung zwischen Arthritis und Arthrose entwickeln.

Summary

The immune system is a complex network, which consists of different organs, cells and molecules. These are connected in an equally complex manner by signalling mediators, such as cytokines and chemokines. Autoimmune diseases, like rheumatoid arthritis, are characterized by a deregulation of this tightly controlled network which results in an immune response against the host's own cells and tissues. In addition to auto-aggressive T and B cells, which are well studied in the context of rheumatoid arthritis, the less well characterised NK cells also play an important role in the initiation and maintenance of auto-immune reactions through their capability to secrete large amounts of cytokines. Peripheral blood NK cells can be distinguished as CD56^{dim}CD16⁺ or CD56^{bright}CD16⁺ according to the expression of their surface markers CD56 and CD16. Similar to T cells, the function of NK cells is the secretion of cytokines and chemokines and the elimination of degenerated cells by direct cytotoxicity.

In this work, CD6 is described as a new differentially expressed marker for CD56^{dim} NK cells. First described on T cells, CD6 is also expressed on the majority of peripheral CD56^{dim} NK cells. According to these new findings, peripheral NK cells in healthy donors can be classified into CD56^{dim}CD6⁺, CD56^{dim}CD6⁻ and CD56^{bright}CD6⁻ NK cells whereby the CD56^{dim}CD6⁺ fraction dominates in the periphery. Regarding the function of CD6 on CD56^{dim} NK cells, it could be shown in this work that stimulation of CD6 did not result in degranulation, but secretion of cytokines (IFN γ , TNF α und IL-17) and chemokines (CXCL12, CXCL8, CXCL10, CXCL1). Therefore, the expression of CD6 on NK cells characterizes a CD56^{dim} subpopulation, which correlates with a differential pattern of cytokine/chemokine secretion.

NK cells are able to coordinate the immune response either *via* cytokines/chemokines or *via* direct contact to immune cells (e.g. dendritic cells or T-cells). Therefore, the second part of this work was to describe the function of NK cells in rheumatoid arthritis, an autoimmune disease of the joints with a significant involvement of pro-inflammatory cytokines in disease development and progression. The NK cell subpopulations in the peripheral blood and in the synovial fluid were compared in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. An inverse distribution of the two NK-cell subpopulations was found, with an enrichment of the CD56^{bright}CD16⁻CD6⁻ NK cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. Further evidence for the selective accumulation of this subpopulation was demonstrated by the analysis of additional NK-cell markers (NKp46, NKp30, NKG2A/CD94 and NKG2D). However, the strongest marker among >20 tested for the infiltration of NK cells was the absence of CD6.

Furthermore, the NK-cell subpopulations differ between their chemokine receptor repertoire, with CD56^{bright} NK cells expressing CXCR3 exclusively, which is the chemokine receptor for CXCL10 (IP-10) and CXCL9 (MIG). In contrast, CD56^{dim} NK-cells express mainly CXCR1 und CXCR2, the receptors for CXCL8 (IL-8) und CXCL1 (GRO α). The analysis of chemokines in the synovial fluid and plasma of arthritis and osteoarthritis patients showed a significant enrichment of CD56^{bright} NK-cell attracting chemokines (CXCL10 und CXCL9), selectively recruiting these cells to the synovial fluid. However, chemokines (CXCL8 und CXCL1) recruiting CD56^{dim} NK-cell could be found in the synovial fluid as well, demonstrating that other mechanisms must be responsible for the absence of CD56^{dim}CD16⁺CD6⁺ NK cells in the synovial fluid.

The detailed analysis of the cytokines in the SF and plasma of the two patient groups showed that the NK-cell and T-cell related cytokines Th1 (IFN γ , IL-2, TNF α , TNF β), Th2 (IL-4, IL-10, IL-13, GM-CSF) and TH17 (IL-17, IL-22) were significantly enriched in the SF and plasma fractions of rheumatoid arthritis patients but not in osteoarthritis patients. For this reason, a clear discrimination between the two degenerative diseases can be made through the use of the cytokine pattern. The pathological end point of both diseases is the degeneration of the joints, whereby in rheumatoid arthritis it is reached by an immune response mediated by Th1/Th17 cells and in osteoarthritis there is no autoimmune inflammation.

These findings will help to facilitate the development of a more explicit differential diagnosis between rheumatoid arthritis and osteoarthritis.

B. Einleitung

1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem besteht aus einem komplexen Netzwerk aus Zellen, Geweben und Organen, deren Aufgabe es ist, den Körper vor Angriffen pathogener Mikroorganismen, Viren und Parasiten zu schützen. Je nach Antigenspezifität und Kinetik der Aktivierung wird das Immunsystem in zwei Komponenten, die „unspezifische“ angeborene und die „spezifische“ erworbene (adaptive) Immunität unterteilt. Das angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie in der Bekämpfung von eingedrungenen Pathogenen. Neben den zellulären Komponenten, bestehend aus Monozyten, Makrophagen, Dendritischen (DC)- und natürlichen Killer (NK) Zellen, gehören auch Moleküle des Komplementsystems zum Repertoire der angeborenen Immunantwort. Einen weiteren wichtigen Bestandteil des angeborenen, aber auch des adaptiven Immunsystems bilden Zytokine und Chemokine. Hierbei handelt es sich um Proteine, die von verschiedenen Zellen sezerniert werden können und als Signal- und Aktivierungsmoleküle wirken. Dabei steuern Zytokine, wie Interferone oder Interleukine die Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems. Bei den Chemokinen handelt es sich dagegen um chemotaktisch wirkende Zytokine, die von vielen Zelltypen sezerniert werden und Leukozyten anlocken und aktivieren können (siehe Abschnitt B.3.2, Seite 21). Hat ein Pathogen die physikalischen (z.B. Epithelzellschicht) und chemischen (z.B. Magensäure) Barrieren des Körpers durchdrungen, erkennen Mustererkennungsrezeptoren (*engl.: pattern recognition receptors, PRR, z.B. Toll-like-Receptors, TLR*) auf den Zellen des angeborenen Immunsystems unspezifische, pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (z.B. Lipopolysaccharide, LPS) auf der Oberfläche der Pathogene (*engl.: pathogen associated molecular patterns, PAMP*). Neben der Pathogenzerstörung können die Zellen des angeborenen Immunsystems auch eine Entzündungsreaktion auslösen, indem sie proinflammatorische Zytokine und Chemokine sezernieren, die zur Rekrutierung und Aktivierung anderen Immunzellen, u.a. auch der Zellen des erworbenen Immunsystems, führt. Im Gegensatz zur angeborenen Immunität, mit ihrer „sofort“-Reaktion, setzt die erworbene Immunantwort erst Tage später ein (Abbildung 1).

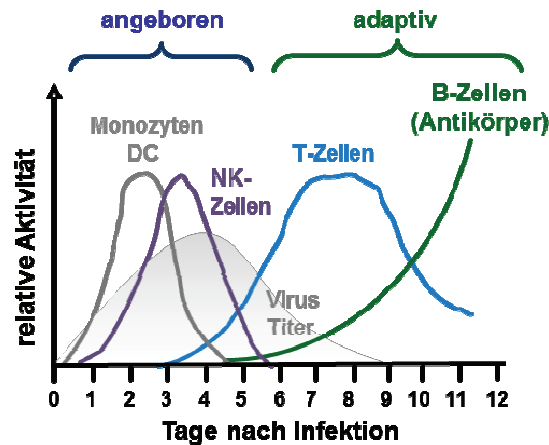


Abbildung 1: Darstellung des zeitlichen Verlaufs einer Immunantwort am Beispiel einer Virus-Infektion.

Dringt ein Virus in den Organismus ein kommt es als erstes zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems (z.B. Monozyten, DC, NK-Zellen) und zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen. Die Antwort des adaptiven Immunsystems auf diese Botenstoffe erfolgt jedoch erst mit einigen Tagen Verzögerung. Nach der erfolgreichen Bekämpfung der Virusinfektion bilden T- und B-Zellen Gedächtniszellen, die im Falle einer „Wieder-Infektion“ nun schneller agieren können.

Die erworbene Immunantwort besteht aus den beiden Zellpopulationen der B- und T-Lymphozyten, die durch klonale Rekombination ihrer Antigenrezeptoren hoch-spezialisiert und effektiv in der Abwehr von Erregern sind. Die Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt durch Antigen-präsentierende-Zellen (APZ), bestehend aus Dendritischen Zellen (DC), B-Zellen und Makrophagen. Diese nehmen aktiv extrazelluläre Pathogene (z.B. Bakterien) auf, verdauen sie lysosomal und präsentieren diese pathogen-spezifischen Peptide in humanen-Leukozyten-Antigen-Komplexen (HLA) der Klasse-II, auf ihrer Oberfläche. Man unterscheidet bei den HLA-Komplexen zwischen zwei Klassen: den HLA-Klasse-I-Molekülen, die auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden und den HLA-Klasse-II-Molekülen, deren Expression auf APZ beschränkt ist, aber auch auf IFN- γ stimulierten Zellen zu finden sind. Andere Pathogene, wie z.B. Viren, dringen im Gegensatz zu Bakterien in Körperzellen ein, woraufhin die viralen Peptide ebenfalls auf der Oberfläche in HLA-Komplexen, hier jedoch der Klasse-I, präsentiert werden. Durch diese unterschiedliche Art der Pathogen-Peptid-Präsentation können unterschiedliche Zellen des adaptiven Immunsystems aktiviert werden. So können T-Lymphozyten, je nachdem welche HLA-Molekül-Klasse sie mit ihrem T-Zell-Rezeptorkomplex (TZR+CD3) erkennen, in CD4+Helfer T-Zellen (binden an HLA-Klasse-II) oder CD8+ zytotoxische T-Zellen (binden an HLA-Klasse-I) unterteilt werden. CD4+ T-Helfer-Zellen binden mit ihrem TZR-Komplex an die Pathogenpeptid-beladenen HLA-Klasse-II-Moleküle der APZ, wodurch sie aktiviert werden und Zytokine freisetzen. Diese wiederum stimulieren B-Zellen zur Proliferation und Ausschüttung von Antikörpern. Pathogene oder Zellen, die durch Antikörper „markiert“ werden (Opsonisierung), können nun von Makrophagen aufgenommen oder von NK-Zellen mittels ihres Fc γ RezeptorIII (Fc γ RIII oder

CD16) erkannt und lysiert werden. Die zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten binden dagegen mit ihrem TZR-Komplex an Pathogen- oder Tumorpeptid-tragende HLA-Klasse-I-Moleküle, die daraufhin infizierte Körperzellen abtöten können. Sind kernhaltige Zellen jedoch nicht von Erregern befallen, präsentieren sie in den HLA-I-Molekülen körpereigene Peptide, die T-Lymphozyten in ihrer Entwicklung im Thymus als „Selbst“-Peptide zu unterscheiden und tolerieren gelernt haben. Nach einer erfolgreichen Bekämpfung der Infektion bilden sich aus den T- und B-Lymphozyten antigenspezifische Gedächtniszellen, die über einen langen Zeitraum erhalten bleiben und bei einer erneuten Infektion in der Lage sind, die Pathogene schneller und effektiver zu bekämpfen. Neu ist dagegen die Annahme, dass auch NK-Zellen Gedächtniszellen ausbilden [1].

Obwohl das Immunsystem in die Bereiche der angeborenen und adaptiven Immunität unterteilt wird, sind beide eng miteinander verbunden. So werden z.B. T und B Lymphozyten über die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch Zellen des angeborenen Immunsystems angelockt, oder CD4⁺ T-Lymphozyten durch direkten Zell-Zellkontakt mit APZ, die zur angeborenen Immunität gezählt werden, aktiviert. Auch NK-Zellen, die im Gegensatz zu den zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten ohne vorherige Aktivierung maligne oder virusbefallene Zellen zerstören können, weisen eine enge Verbindung zu dem adaptiven Immunsystem auf. Durch die Freisetzung von Zytokinen oder durch die Interaktion mit Dendritischen Zellen, die wiederum T-Zellen stimulieren können, nehmen NK-Zellen Einfluss auf eine nachfolgende Immunantwort. In einer kürzlich veröffentlichten Studie an Mäusen, die mit dem lymphozytären-Choriomeningitis-Virus (LCMV) infiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen in der frühen Phase der Infektion sogar in der Lage sind, CD4⁺ T-Lymphozyten, die während der Infektion die CD8⁺ T-Lymphozyten bei der Bekämpfung des Virus unterstützen, zu eliminieren. Die NK-Zellen können indirekt somit die Stärke einer antiviralen Immunantwort regulieren [2].

1.1 Natürliche Killer-Zellen

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) wurden Mitte der 70er Jahre von Kiessling und Klein aufgrund ihrer Fähigkeit, bestimmte Maustumorzellen *in vitro* zu töten, beschrieben [3]. Da NK-Zellen an der frühen Immunantwort beteiligt sind und keine Antigen-spezifischen Rezeptoren aufweisen, bilden sie mit Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Granulozyten den angeborenen Teil des Immunsystems. Dabei vereinen sie sowohl die Eigenschaften der angeborenen wie auch der adaptiven Immunität und werden daher oft als eine Art „Brücke“ zwischen den beiden Systemen bezeichnet. Morphologisch werden humane NK-Zellen als große, granuläre Lymphozyten beschrieben, die phänotypisch anhand ihrer CD56 Expression identifiziert werden können [4]. CD56 oder NCAM (*engl. neural cell adhesion molecule*=NCAM) ist ein Adhäsionsmolekül dessen Funktion bislang nicht geklärt

werden konnte. Etwa 90% aller NK-Zellen exprimieren CD56 in geringer Dichte und werden daher CD56^{dim} genannt. Die verbleibenden 10% exprimieren CD56 in höherer Dichte und werden als CD56^{bright} NK-Zellen bezeichnet. Anders als bei den zytotoxischen T-Lymphozyten können NK-Zellen maligne und virusinfizierte Zellen ohne eine vorhergehende Aktivierung (*priming*) erkennen und lysieren. Dabei besitzen NK-Zellen nicht nur einen spezifischen Rezeptor, wie T- und B-Lymphozyten, sondern verfügen über eine Vielzahl an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. Die Gesamtheit der eingehenden Signale ermöglicht daher eine feine Regulation des Aktivierungszustands einer NK-Zelle. Überwiegen in der Gesamtheit die aktivierenden Signale kann es zu einer Aktivierung der zytotoxischen Funktion von NK-Zellen kommen. Diese basiert auf einer gerichteten Exozytose intrazellulärer Granula, die konstitutiv exprimiertes Granzym A/B und Perforin speichern [5]. Während der Bildung einer immunologischen Synapse zwischen der NK-Zelle und ihrer Zielzelle werden die Granulae (Abbildung 2) durch einen Mikrotubuli-vermittelten Umstrukturierungsprozess in Richtung der Kontaktstelle polarisiert, um dort mit der Zellmembran zu verschmelzen. Dieser als Degranulation bezeichnete Prozess führt zur Ausschüttung von monomerem Perforin, welches in Anwesenheit von Kalzium (Ca^{2+}) ein ringförmiges Polymer in der Membran der Zielzelle bildet und dadurch zum einen die Membranintegrität zerstört und zum anderen das Eindringen von Apoptose-induzierenden Granzymen in die Zielzelle ermöglicht [6]. Neben dieser indirekten Form können NK-Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) auch direkt durch Bindung ihres Fas-Liganden (CD95L) an den Fas-Rezeptor (CD95) auf Zielzellen und einer dadurch ausgelösten proteolytischen Enzymkaskade auslösen. Eine weitere direkte Art der Zellyse erfolgt über die als ADCC (*engl. Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*) bezeichnete Effektorfunktion der NK-Zellen. Hierbei bindet CD16, ein niedrigaffiner $\text{FC}\gamma\text{RIII}$ auf NK-Zellen, an den Fc-Teil von IgG-Antikörpern, welche an Antigenstrukturen von Körperzellen gebunden haben. Durch diese Bindung wird die NK-Zelle über CD16-Signale aktiviert und kann über die Ausschüttung von zytotoxischen Molekülen (Degranulation) diese Zellen eliminieren.

Die inhibierenden Rezeptoren der NK-Zellen erkennen hauptsächlich HLA-Moleküle der Klasse I, unabhängig davon welche Peptide von ihnen präsentiert werden. HLA-Klasse-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und bestehen aus einem trimeren, extrazellulären Komplex, bestehend aus einer schweren Kette mit drei extrazellulären Domänen ($\alpha 1-3$), einer Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Teil, sowie einem $\beta 2$ -Mikroglobulin ($\beta 2\text{-m}$) und einem zu präsentierten Peptid. Das $\beta 2$ -Mikroglobulin assoziiert im endoplasmatischen Retikulum (ER) nicht-kovalent an die schwere Kette und dient, zusammen mit dem Peptid der Stabilisation des Komplexes an der

Zelloberfläche. Die Aufgabe der HLA-Klasse-I-Moleküle ist es den CD8+ T-Lymphozyten 8-10 Aminosäure (AS) lange Peptide aus intrazellulären Antigenen zu präsentieren.

Daneben gibt es noch HLA-Klasse-II-Moleküle, die nur von immunregulatorischen Zellen, wie den Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) und IFN- γ stimulierten Zellen exprimiert werden. Diese bestehen, anders als die HLA-Klasse-I-Moleküle aus zwei membranverankerten Untereinheiten (α - und β -Untereinheit) mit je zwei Domänen (α_1 und α_2 sowie β_1 und β_2) und einem Peptid. Dabei präsentieren die APZ (z.B. Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen) den CD4+ T-Lymphozyten 12-25 AS lange extrazelluläre Antigene, welche zuvor internalisiert und verdaut auf die HLA-Klasse-II-Moleküle geladen wurden.

Kommt es zu einer viralen Infektion oder zu einer malignen Transformation der Zelle werden nun nicht mehr zelleigene Proteine auf der Zelloberfläche präsentiert, sondern die Peptide von viralen oder tumorassoziierten Antigenen. Die Bindung des HLA-Peptid-Komplexes an den passenden TZR-Komplex führt zur Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten, die daraufhin die Zelle eliminiert. Im Laufe der Evolution haben viele Viren Mechanismen entwickelt, die HLA-I Expression auf der Zelloberfläche zu unterdrücken oder ganz abzuschalten, wodurch sie der Erkennung durch ZTL entgehen können („immune escape“). Aber auch verschiedene Tumore besitzen die Fähigkeit die HLA-I Expression zu unterdrücken. Geschieht dies, können NK-Zellen die Abwehrfunktion übernehmen. Wie bereits beschrieben, exprimieren körpereigene Zellen im Normalzustand HLA-Klasse-I und vermitteln damit eine Art „Toleranz“ gegenüber NK-Zellen. Durch die abnorme Abwesenheit von HLA-Klasse-I-Molekülen erhalten die NK-Zellen nun kein inhibierendes Signal mehr, werden aber durch die Stimulation ihrer aktivierenden Liganden aktiviert und sind nun in der Lage die Zielzelle zu lysieren. Diese Art der Zellregulation für NK-Zellen wurde 1985 von Klas Kärre in der „Missing self“ Hypothese beschrieben [7]. Neuere Studien zeigen jedoch, dass diese Hypothese allein nicht ausreicht, um die NK-Zell-Selbsttoleranz zu erklären. Erythrozyten exprimieren, anders als kernhaltige Zellen, wenig aktivierende Liganden aber auch kaum HLA-Moleküle. Obwohl Sie dadurch zwar wenig aktivierende, jedoch keine inhibierende Signale an NK-Zellen geben, werden sie nicht von ihnen eliminiert. 2005 schlugen Kumar und McNerney in ihrer „at least one“-Hypothese vor, dass NK-Zellen im Knochenmark nur dann reifen, wenn sie mindestens einen selbst-HLA-Klasse-I-spezifischen, inhibitorischen Rezeptor exprimieren [8]. Diese Annahme wurde unterstützt durch die Beobachtung, dass HLA-I-defiziente Menschen und Mäuse zwar eine normale Anzahl an NK-Zellen haben, diese aber hyporeaktiv gegen HLA-Klasse-I defiziente Zielzellen sind [9]. Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass NK-Zellen durch die Stimulation der inhibitorischen Rezeptoren „erzogen“ werden müssen. Der zugrundeliegende Mechanismus ist hier allerdings noch nicht geklärt, wird aber anhand verschiedener Modelle diskutiert. So beschreibt das „Arming-“, oder auch „licensing“-Model, dass unreife NK-Zellen nicht- oder

hyporeaktiv sind und erst über die Interaktion einer ihrer inhibitorischen Rezeptoren mit einem selbst-HLA-I-Molekül funktionell kompetent werden und weiter differenzieren [10]. Das „disarming“-Model beschreibt hingegen, dass unreife NK-Zellen bereits autoreaktiv sind, aber durch das Fehlen eines inhibitorischen Signals anergisch werden [11]. Sowohl das „arming“- als auch das „disarming“-Model gehen davon aus, dass NK-Zellen entweder an- oder abgeschaltet werden. Im Gegensatz dazu konnte kürzlich eine Korrelation zwischen der NK-Zell-Reaktivität und der Stärke des inhibitorischen Signals beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die NK-Zell-„Erziehung“ auf eine quantitative Weise geschieht. Die Annahme, dass die NK-Zell-Reaktivität entweder vermindert („disarming“-ähnlich) oder verstärkt („arming“-ähnlich) werden kann, beschreibt das „rheostat“-Model [12]. In transformierten oder Virus-infizierten Zellen tritt neben dem Verlust von HLA-Klasse-I-Molekülen auch eine vermehrte Expression bestimmter aktivierender Liganden (meist Liganden des aktivierenden NK-Rezeptors NKG2D) auf, was als „induced self“ bezeichnet wird. Durch die erhöhte Expression aktivierender Liganden auf Zielzellen können NK-Zellen, trotz der Anwesenheit von HLA-Klasse-I (inhibitorisches Signal) aktiviert werden und die Zielzelle lysieren.

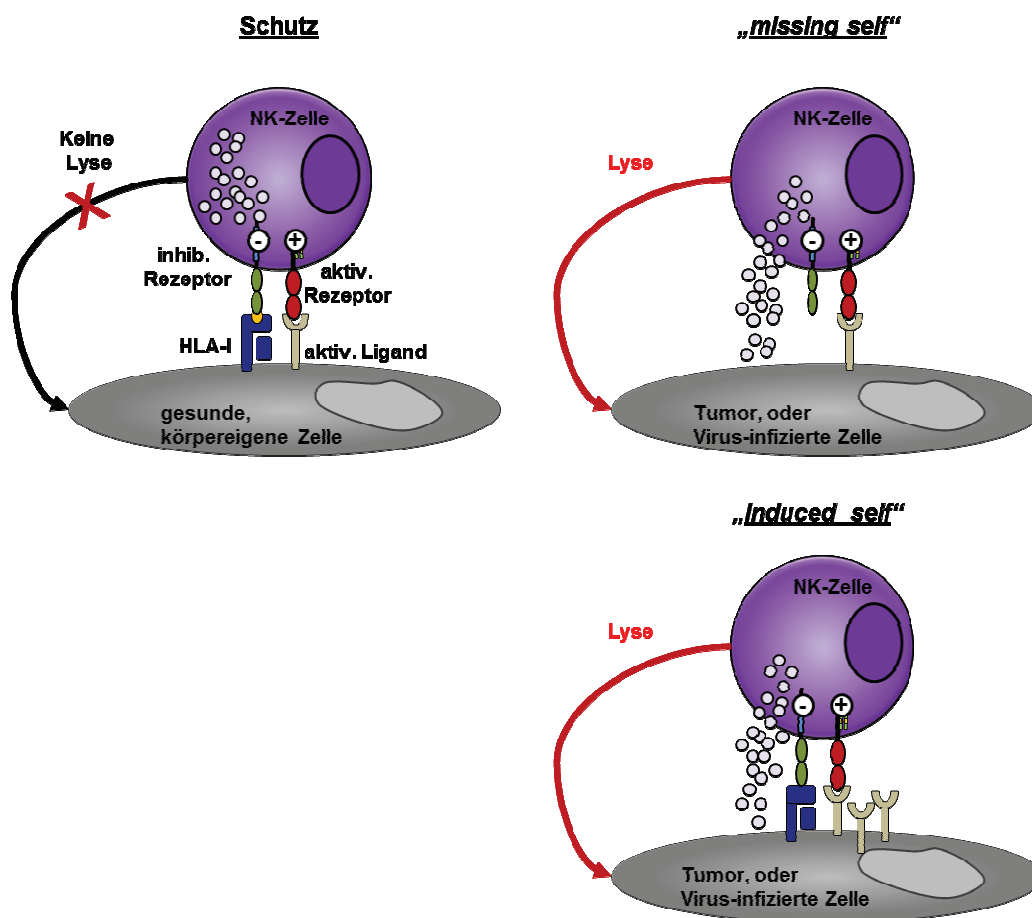


Abbildung 2: Die Balance zwischen inhibitorischen und aktivierenden Signalen bestimmt die Reaktivität von NK-Zellen.

Die NK-Zell-Aktivierung ist durch eine Balance aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren reguliert. Exprimieren gesunde, körpereigene Zellen HLA-Klasse-I Moleküle, die an inhibierende Rezeptoren von NK-Zellen binden, vermitteln sie einen Selbst-Schutz vor der Lyse durch NK-Zellen (Schutz). Nach Transformation von Zellen kommt es jedoch häufig zu einem Verlust oder einer verminderten Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen auf deren Oberfläche. Damit bekommen NK-Zellen kein inhibierendes Signal und werden aktiviert („missing self“). Darüber hinaus führen zellulärer Stress und DNS-Schäden in den Zielzellen zu einer verstärkten Expression aktivierender Liganden für NK-Zell-Rezeptoren und es kommt trotz Anwesenheit von inhibitorisch wirkendem HLA-I zu einer Aktivierung der NK-Zellen („induced self“).

Neben der direkten Lyse von Zellen können NK-Zellen auch Zytokine und Chemokine freisetzen. Vor allem CD56^{bright} NK-Zellen sind als Zytokin- (IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-13 und GM-CSF) produzierende Zellen beschrieben, die darüber hinaus aber auch eine, im Vergleich zu CD56^{dim} NK-Zellen, geringere Zytotoxizität aufweisen [13]. Neuere Studien und Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass dieses NK-Zell-Zytokinrepertoire jedoch noch erweitert werden kann und dass prinzipiell alle NK-Zellen nach Stimulation mit HLA-Klasse-I negativen Zielzellen oder über Zytokine, wie IL-12 und IL-15, dazu in der Lage sind, verschiedene Zytokine zu produzieren und damit der nachfolgende Immunantwort eine pro- oder antiinflammatorische Richtung vorzugeben. Die Rollenverteilung zwischen den NK-Subpopulationen kann deshalb nicht mehr so apodiktisch getrennt werden.

Obwohl ein immunologisches Gedächtnis bisher allein den T- und B-Lymphozyten zugeschrieben wurde, lassen die Ergebnisse neuerer Untersuchungen vermuten, dass NK-Zellen ebenfalls langlebige Gedächtniszellen ausbilden können. Um dies zu zeigen, wurden C57/BL6 Mäuse mit dem Maus-Zytomegalie-Virus (MCMV) infiziert und die erfolgreiche Immunantwort durch Expression des aktivierenden Ly49H Rezeptors, der das Virusprotein m157 auf infizierten Zellen erkennt, festgestellt. Bereits hier konnte gezeigt werden, dass Ly49H⁺ NK-Zellen zunächst stark proliferieren und nach Abklingen der Infektion auf eine moderate Anzahl schrumpfen. Der Transfer dieser Ly49H⁺ NK-Zellen in virusfreie C57/BL6 Mäuse führte nach Infektion mit MCMV-Viren zu einer zweiten Expansion der Ly49H⁺ NK-Zellen und zu einem Schutz der Mäuse [1]. Während einer akuten Infektion mit humanen Zytomegalie-Viren (HCMV) oder mit Hantaviren kann ebenfalls eine verstärkte Anwesenheit von NK-Zell-Subpopulationen im Blut und ein Langzeitüberleben von bestimmten NK-Zellen beobachtet werden [14, 15].

1.1.1 NK-Zell-Rezeptoren

NK-Zellen exprimieren, anders als T- und B-Zellen, nicht einen funktionell relevanten Rezeptor, sondern werden über eine Vielzahl an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren reguliert. Dabei stehen die Signale der inhibierenden Rezeptoren immer denen der aktivierenden Rezeptoren, in einem fein abgestimmten Gleichgewicht gegenüber. Inhibierende Rezeptoren erkennen Liganden wie HLA-Klasse-I, die typischerweise auf gesunden Zellen exprimiert sind und bei Stress, Infektionen und malignen Transformationen herunterreguliert werden. Dem gegenüber stehen die aktivierenden Rezeptoren, die

Liganden erkennen, deren Expression bei Stress, Infektionen oder malignen Transformationen erhöht sein kann (Abbildung 3). Das NK-Zell-Rezeptor-Repertoire umfasst im Wesentlichen drei große Familien: die Killer-Immunoglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR), die C-Typ-Lektin-Rezeptoren und die Natürlichen-Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCR), welche im Folgenden beschrieben werden.

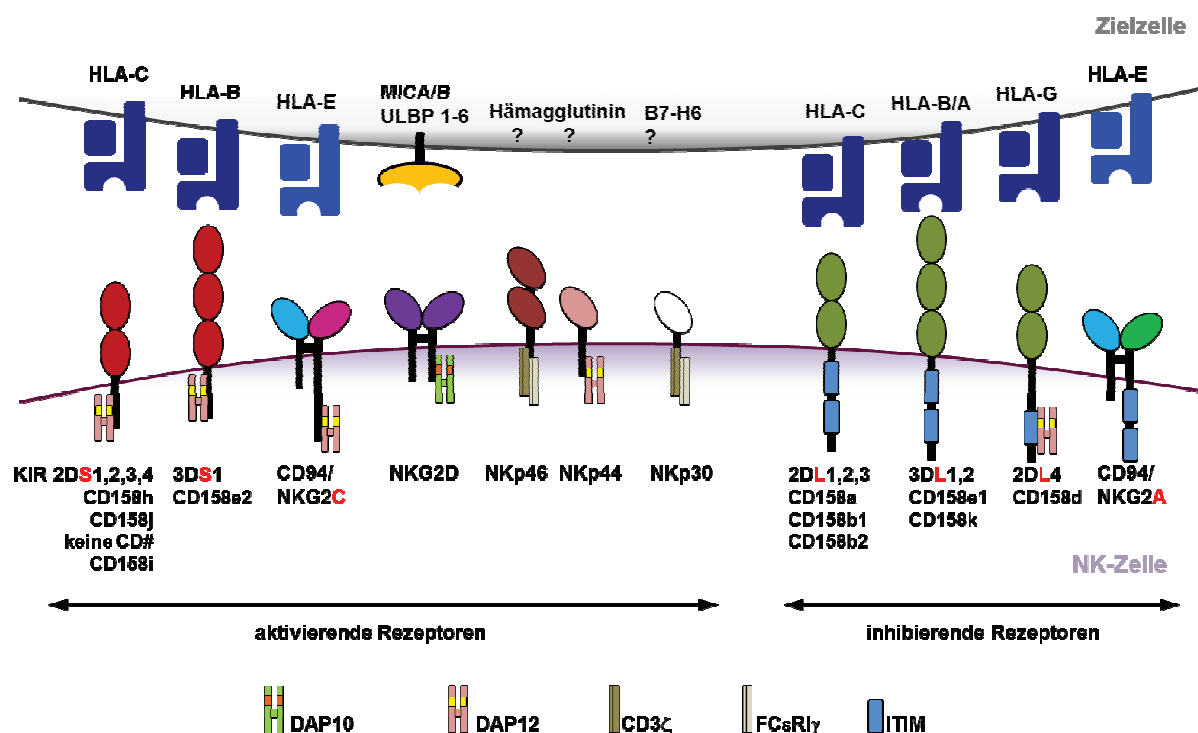


Abbildung 3: Schematische Darstellung aktivierender und inhibierender NK-Zell-Rezeptoren.

Inhibierende Moleküle sowie NKG2A oder iKIR (inhibierende KIR) tragen ITIM-Sequenzen in ihrem langen zytoplasmatischen Teil. KIRs gehören zur Immunglobulin-Superfamilie, die an verschiedene Allele der HLA-Klasse-I Moleküle binden. Dagegen gehört das Heterodimer NKG2A/CD94 zu der C-Typ-Lektin-Familie und erkennt HLA-E. Dem gegenüber stehen die aktivierenden Rezeptoren, die keine eigene Signalsequenz tragen und daher mit Adaptermolekülen assoziieren. Zu ihnen gehören aktivierende KIR-Moleküle (aKIR), welche wie die iKIR an HLA-Klasse-I Moleküle binden, sowie die natürlichen-zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCR) und das Heterodimer CD94/NKG2C, welches wie CD94/NKG2A an HLA-E bindet.

Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR)

Die Mitglieder der Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR) gehören zu der Immunglobulinsuperfamilie, die auf Chr. 19q13 von 16 KIR-Genen kodiert werden, wobei sich darunter zwei nicht exprimierte Pseudogene (KIR2DP1 und KIR3DP1) befinden. Ihre Nomenklatur orientiert sich an dem strukturellen Aufbau aus einem Transmembranglykoprotein (Typ I), das die zwei (KIR2D) oder drei (KIR3D) extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen mit einer kurzen (*engl. short*, S) oder langen (*engl. long*, L) intrazellulären Domäne verbindet [16] (Abbildung 3). Die langen intrazellulären Domänen der inhibitorischen Rezeptoren (KIR2DL und KIR3DL) enthalten eine oder zwei tyrosinhaltige ITIM-Domänen (*engl.: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*, I/S/T/LxYxxL/V) die

von src-Kinasen (syk und fyn) phosphoryliert werden können und damit zur Rekrutierung von SHP1- und SHP2-Phosphatasen führen. Indem diese nun ebenfalls phosphoryliert und damit aktiviert werden, können sie Signaltansduktionsmoleküle der aktivierenden Rezeptoren dephosphorylieren und somit zu einer schnellen und effektiven Deaktivierung der NK-Zell-Effektorfunktionen führen [17]. Dagegen besitzen die KIR mit einer kurzen intrazellulären Domäne (KIR2DS und KIR3DS) positiv geladene Aminosäuren im TM-Teil, an die Adaptermoleküle mit aktivierenden ITAM (*engl.: immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)-Domänen binden können und durch Weiterleitung der aktivierenden Signale zur Induktion der NK-Zell-Effektorfunktion führen [18]. Die Liganden der KIR-Moleküle sind die klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle HLA-A, -B und -C, wobei HLA-C-Moleküle die wichtigsten Liganden darstellen. HLA-C kann durch den Austausch von zwei Aminosäuren (Pos. 77 und 80) in seiner $\alpha 1$ -Domäne in die zwei Gruppen HLA-C1 und -C2 eingeteilt werden, wovon die jeweiligen KIR-Rezeptoren wiederum verschiedene Allele erkennen [19]. Neben HLA-C werden von den KIR-Rezeptoren auch Allele des HLA-B-Moleküls erkannt. Erst kürzlich wurde eine neue KIR-Assoziation beschrieben, nach der KIR3DL2 an extrazelluläre, mikrobielle CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) binden kann und nach Internalisierung und Bindung an den Toll-like-Rezeptor 9 zur NK-Zellen-Aktivierung und Zytokin Produktion führen [20]. Der Rezeptor KIR2DL4 nimmt eine Sonderrolle unter den KIRs ein, da er neben einer eigenen zytoplasmatischen ITIM-Domäne auch eine Bindestelle für ITAM-tragende Adaptermoleküle besitzt. Damit kann er sowohl inhibierende als auch aktivierende Signale weiterleiten. Nachdem die inhibitorischen und aktivierenden KIR im Aufbau ihrer extrazellulären Domäne nahezu identisch sind, ist auch die Ligandenspezifität nahezu gleich. Jedoch binden die inhibitorischen KIR-Moleküle ihre HLA-Liganden mit einer höheren Affinität als die entsprechenden aktivierenden KIRs. Da die extrazellulären Domänen der KIR Moleküle strukturell den gleichen Aufbau aufweisen kann anhand monoklonale Antikörper nicht zwischen aktivierenden und inhibierenden KIR-Molekülen unterschieden werden.

Rezeptoren der C-Typ-Lektin-Familie

Die zweite große Gruppe der NK-Zell-Rezeptoren sind die C-Typ-Lektin-Rezeptoren, denen auch die Gruppe der Selektine angehört, welche eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und -migration spielen. Charakteristisch für diese Rezeptoren ist ihre Kohlenhydrat-Erkennungsregion (carbohydrate recognition domain; CRD), die in Kalzium-abhängiger Weise an Zielstrukturen der Liganden binden kann. Zu ihnen gehört das inhibitorische Heterodimer CD94:NKG2A und seine aktivierenden Gegenstücke CD94:NKG2C und CD94:NKG2E. Beide Komplexe binden an das nicht-klassische HLA-Klasse-Ib Molekül HLA-E, welches Nonamer-Peptide aus der Leadersequenz anderer HLA-Moleküle präsentiert

[21]. Der zytoplasmatische Anteil von NKG2A trägt zwei ITIMs und vermittelt so eine Inhibition [22]. Die aktivierenden Isoformen NKG2C und NKG2E assoziiert mit dem Adaptermolekül DAP12 welches über Tyrosin-Kinasen die NK-Zell-Aktivierung, wie bei den aktivierenden KIR-Rezeptoren, vermittelt.

Ein weiteres Mitglied der C-Typ-Lektin-Familie ist NKG2D. Im Gegensatz zu den heterodimerbildenden Molekülen NKG2A und NKG2C bildet NKG2D aktivierende Homodimere, die stressinduzierte MHC-Klasse-I-assoziierte Moleküle MICA/B (*engl.: MHC class I chain-related gene*) und ULBP1-6 (*engl.: unique long 16-binding protein*) binden und durch die Assoziation mit dem DAP12 verwandten Adapterprotein DAP10 einen aktivierenden Komplex bilden [23]. Im humanen System ist NKG2D neben NK-Zellen auch auf $\gamma\delta$ und nahezu allen $CD8^+\alpha\beta$ T-Lymphozyten exprimiert. NKG2D wirkt auf NK-Zellen als ein eigenständiger aktivierender Rezeptor, jedoch scheint er auf T-Zellen nur kostimulierende Eigenschaften zu besitzen.

Neben den NKG2 Rezeptoren gibt es auch die Selektine, die ebenfalls zur Familie der C-Typ-Lektine gehören. Sie setzen sich zusammen aus E-, L- und P-Selektin, von denen jedoch nur L-Selektin (CD62L) auf Leukozyten exprimiert wird. E-, und P-Selektin sind dagegen auf Endothelzellen zu finden. CD62L spielt eine wichtige Rolle im initialen Kontakt zwischen den im Blutstrom befindlichen Leukozyten und den gefäßauskleidenden Endothelzellen während des Migrationsprozesses in das umliegende Gewebe (siehe B.3.2, Seite 21) [24]. Die Liganden von CD62L sind Glykoproteine wie CD34 und GlyCAM.

Natürliche-Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCRs)

Die Gruppe der Natürlichen-Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCRs) gehört, wie die KIR zu der Ig-Superfamilie und umfasst die aktivierenden Rezeptoren NKp46 (CD335), NKp80 (keine CD Nummer vergeben) und NKp30 (CD337), welche auf NK-Zellen konstitutiv exprimiert werden. Dazu gehört auch NKp44 (CD336), das jedoch nur nach Stimulation (z.B. IL-2) auf NK-Zellen exprimiert wird [17]. Im Gegensatz zu den KIR und C-Typ-Lektin-Rezeptoren, die auch auf T-Zellen exprimiert werden können, sind die NCR die bisher einzig bekannten NK-Zell-Rezeptoren, deren Expression weitestgehend auf NK-Zellen beschränkt ist [25]. Dies gilt vor allem für NKp46, da die Expression von NKp44 auch auf der Oberfläche von plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC) [26] und die Expression von NKp30 auf aktivierten T-Lymphozyten aus der Nabelschnur beobachtet wurde [27]. Obwohl einige Interaktionen der NCR mit viralen Proteinen beschrieben wurden (z.B. NKp44 und NKp46 mit Hämagglutinin des Influenza Virus) ist nur sehr wenig bekannt über die Liganden der NCR. Es konnte gezeigt werden, dass NKp30, NKp44 und NKp46 verschiedene Heparansulfat-Mikrodomänen von Tumorzellen erkennen und dass humanes HLA-B-assoziiertes Transkript

3 (BAT3) und B7-H6 Tumorzell-Liganden für NKp30 sind. Die Signaltransduktion von NKp30 und NKp46 erfolgt über die Moleküle CD3 ζ und Fc ϵ RI γ welche beide eine ITAM-Domäne besitzen [28, 29]. NKp44 assoziiert hingegen mit dem Adaptermolekül DAP12, welches ebenfalls eine ITAM-Domäne besitzt.

1.1.2 NK-Zell-Subpopulationen

Das klassische phänotypische Merkmal von humanen NK-Zellen ist die Expression des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) CD56 sowie des Fc γ Rezeptor III (Fc γ RIII) CD16 bei gleichzeitiger Abwesenheit von CD3. Bei einigen NK-Zell-Rezeptor-Molekülen kann die CD3- ζ -Kette jedoch als signalgebender Adapter fungieren (z.B. NKp46). Aufgrund der Expressionsdichte von CD56 können NK-Zellen in zwei Populationen unterteilt werden, die sich in der Expression weiterer Rezeptoren unterscheiden können. So exprimieren etwa 90% der NK-Zellen aus dem Blut CD56 in geringer und CD16 in hoher Dichte und werden daher als CD56^{dim}CD16⁺ Zellen bezeichnet. Die restlichen 10% weisen hingegen eine hohe CD56 Expressionsdichte auf und tragen kein CD16 (-) auf ihrer Oberfläche, weshalb sie CD56^{bright}CD16⁻ Zellen genannt werden. Neben CD16 exprimieren ausschließlich CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen aktivierende und inhibierende KIR Moleküle.

Funktionell lassen sich die beiden Subpopulationen ebenfalls unterscheiden. So verfügen CD56^{bright}CD16⁻ über ein schwächeres zytotoxisches Potential als CD56^{dim} NK-Zellen, sezernieren aber weitaus größere Mengen an Zytokinen wie Interferon (IFN)- γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- α , GM-CSF (Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) sowie Interleukin (IL)-10 und IL-13 wodurch sie die nachfolgende Immunantwort regulieren können [30]. CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen haben hingegen ein höheres zytotoxisches Potential, setzen aber geringe Mengen an Zytokinen frei.

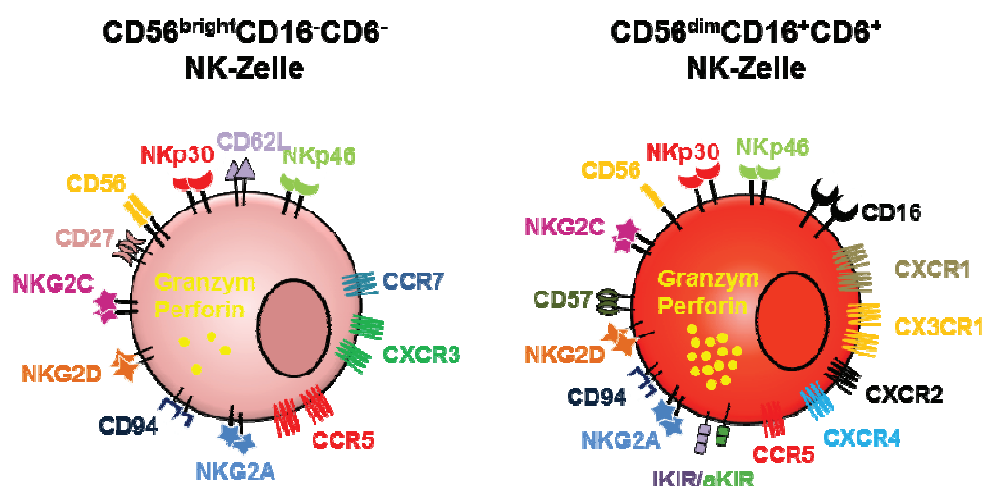


Abbildung 4: Schematische Darstellung der CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zell-Subpopulationen.

Relative Expressionsstärken von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf peripheren CD56^{bright} (rosa) oder CD56^{dim} (rot) NK-Zellen gesunder Spender. Etwa 90% der peripheren NK-Zellen exprimieren CD56 in geringer Intensität auf ihrer Oberfläche und werden daher mit der Bezeichnung „dim“ beschrieben. Dagegen exprimieren die verbleibenden 10%, CD56 in hoher Intensität, weshalb sie als „bright“ NK-Zellen bezeichnet werden. Die CD56^{dim} NK-Zellen weisen eine hohe Expression an CD16 (Fcγ-Rezeptor III) und KIR auf und exprimieren CD94/NKG2A schwächer als die CD56^{bright} NK-Zellen. Diese exprimieren meistens kein CD16 und sind immer KIR-negativ. NKG2D sowie die NCR (NKp46 und NKp30) werden von allen NK-Zellen exprimiert. Zudem zeigen die NK-Zell-Subpopulationen eine unterschiedliche Expression an Chemokinrezeptoren (CD56^{bright}: u.a. CCR5, CCR7 und CXCR3; CD56^{dim}: u.a. CXCR1, CXCR2, CXCR4 und weniger CCR5).

In humanen Tonsillen und Peyer-Plaques (zusammenhängende Ansammlungen von 10 bis 50 Lymphfollikeln im Darm) wurde eine Subpopulation von NK-Zellen beschrieben, die CD56 und NKp44 exprimieren und neben IL-26 und LIF (Leukämie inhibierender Faktor) auch IL-22 sezernieren können. Diese NK-22-Zellen haben damit Ähnlichkeit mit den IL-17 produzierenden Th17-Zellen. Beide exprimieren den Chemokinrezeptor CCR6, sezernieren IL-22 und exprimieren den Transkriptionsfaktor RORγt (engl. retinoic-acid-related orphan receptor γt) [31].

CD57 und CD27 sind zwei weitere Marker, deren Expressionsdichte in Korrelation zu den Effektorfunktionen von NK-Zellen beschrieben wurde. Danach sind die peripheren CD56^{dim} NK-Zellen CD27 negativ und weisen eine große Menge an Perforin und Granzym B auf, die folglich mit einer starken Zytotoxizität einhergehen. Im Gegensatz dazu sind die peripheren CD56^{bright} NK-Zellen CD27⁺, haben eine signifikant geringere Menge an Perforin und Granzym B und ein niedrigeres zytotoxisches Potential [32].

CD57⁺ NK-Zellen befinden sich hauptsächlich in der CD56^{dim} Subpopulation. Aufgrund der geringen Proliferationsfähigkeit und der schwachen Antwort auf Zytokinsignale, sowie einer Zunahme der zytotoxischen Kapazität, beschreibt die steigende Expression dieses Markers möglicherweise eine Art Seneszenz (*lat. Senescere*: altern) der NK-Zellen.

Kürzlich wurde von Jianhua Yu *et.al.* eine weitere NK-Zell-Subpopulation anhand des Expressionsmusters für den C-Typ-Lektin Rezeptor CD94 beschrieben, die sich sowohl phänotypisch als auch funktionell zwischen den CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen befindet. Darüber hinaus wird von den Autoren vermutet, dass diese CD94^{high}CD56^{dim}-Fraktion ein Zwischenglied im Differenzierungsprozess von CD94^{high}CD56^{bright}CD16⁻ zu CD94^{low}CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen darstellt, da die verminderte Dichte von CD94 mit einer verstärkten Expression von zytotoxischen NK-Zell-Rezeptoren und einer geringeren Zytokinproduktion (im Vergleich zu CD56^{bright} NK-Zellen) einhergeht [33]. CD94 wird als Heterodimer mit NKG2A am stärksten von CD56^{bright} NK-Zellen exprimiert. NKG2C, das auch mit CD94 dimerisiert, wird ebenfalls vermehrt auf CD56^{bright} NK-Zellen exprimiert, wenn auch in geringerer Dichte. Andere aktivierende Rezeptoren wie die NCR (NKp30, NKp44 und NKp46) oder NKG2D zeigen eine vergleichbare Expression auf beiden NK-Zellgruppen. Beide Subpopulationen weisen ein für die Migration wichtiges unterschiedliches Repertoire an Adhäsionsmolekülen, Zytokin- und Chemokinrezeptoren auf. Neben der exklusiven

Expression von CXCR3 exprimieren CD56^{bright} NK-Zellen u.a. auch CCR7 [34]. Zusammen mit dem Adhäsionsmolekül L-Selektin (CD62 Ligand) kann CCR7 so die entzündungsunabhängige Migration von CD56^{bright} Zellen in sekundäre lymphatische Organe ermöglichen und damit zu einer Anreicherung in Lymphknoten und Milz beitragen, sofern die attraktierenden Chemokine vorhanden sind [30, 35]. Dagegen exprimieren CD56^{dim} NK-Zellen neben dem Chemokinrezeptor CX3CR1, den Rezeptor für CX3CL1 (Fraktalkine), mehr CXCR1, CXCR2 und CXCR4. Ein Rezeptor, der hingegen von beiden Populationen exprimiert wird ist CCR5.

1.1.3 NK-Zellen im Kontext autoimmuner Gelenkerkrankungen

Zu Beginn ihrer Entdeckung wurden NK-Zellen ausschließlich als Teil des angeborenen Immunsystems angesehen, das entartete und virusbefallene Zellen eliminiert. Heute weiß man, dass sie darüber hinaus über die Freisetzung von Zytokinen und über direkten Kontakt, andere Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems aktivieren und damit auch den Verlauf von Autoimmunkrankheiten beeinflussen können. So sind CD56^{bright} NK-Zellen über die Sezernierung von IL-15 zwar in der Lage Makrophagen zur Differenzierung in Dendritische Zellen (*engl.: dendritic cell, DC*) anzuregen [36], können darüber hinaus aber auch mit ihnen interagieren, wobei sie sich entweder gegenseitig aktivieren [37] oder die NK-Zellen über ihre Rezeptoren NKp30 und NKp46 die Lyse der DC bewirken können [38, 39]. Diese und andere Beobachtungen lassen vermuten, dass NK-Zellen eine regulatorische Rolle über die Autoantigenpräsentation durch APZ spielen und gegebenenfalls sogar deren Präsentation an autoreaktive T-Zellen verhindern könnten. Darüber hinaus können NK-Zellen aktivierte T-Zellen auch direkt eliminieren, wenn diese vermehrt Liganden, z.B. für NKG2D exprimieren. So konnten Studien an Mäusen mit Myelin-Oligodendrozytenglykoprotein (MOG) induzierter experimenteller autoimmuner Encephalomyelitis (EAE) zeigen, dass die inhibierend wirkende Expression von Qa-1-Qdm (Homolog zu humanem HLA-E) auf aktivierten T-Zellen aufgehoben werden kann, indem man durch Antikörperzugabe die Interaktion von Qa-1-Qdm:NKG2A blockiert. Dies wiederum führt zur Aktivierung von NK-Zellen, die nun in der Lage sind autoreaktive T-Zellen zu lysieren und damit zu einer Verbesserung der EAE-Symptome beitragen [40]. Diese Beobachtungen sprechen für eine protektive Rolle der NK-Zellen im Entstehungsprozess und im Verlauf von autoimmunen Krankheiten. Es gibt aber auch Studien, meist in Mausmodellen mit induzierbaren autoimmunen Krankheiten (z.B. Kollagen-induzierter-Arthritis, KIA), welche eine begünstigende Funktion von NK-Zellen beschreiben [41-43]. So führt die NK-Zell-Depletion in KIA-Mäusen zu einer Abnahme des Knochenabbaus und zur Verbesserung der Arthritis-induzierten Symptome. Diese Beobachtung beruhte auf den von NK-Zellen freigesetzten Zytokinen RANKL und M-CSF, welche schließlich die Differenzierung von Monozyten in

knochenabbauenden Osteoklasten vermitteln können [44]. Im Gegensatz dazu konnten jedoch Lo *et. al.* einen schlimmeren Krankheitsverlauf nach NK-Zell-Depletion in Mäusen mit induzierten Arthritis zeigen, welcher mit einer erhöhten Anzahl an Plasmazellen und Autoantikörpern einherging [45]. Die Verwendung von unterschiedlichen Mausstämmen und Modellsystemen, aber auch die Betrachtung von unterschiedlichen NK-Zell-Subpopulationen können Gründe für diese widersprüchlichen Ergebnisse sein. Eine andere Art, wie NK-Zellen zur Pathogenese von Autoimmunkrankheiten beitragen können, ist über den Verlust der Selbst-Toleranz. Untersuchungen von Patienten ohne die inhibierend wirkenden HLA-Klasse-I Liganden (ausgelöst durch einen Defekt im TAP Transport Mechanismus), zeigen in der Tat eine schwere Form der Gewebszerstörung vermittelt durch autoreaktive NK-Zellen [46]. Synoviale Fibroblasten von Arthritis-Patienten weisen eine erhöhte Expression der Stress-induzierten NKG2D Liganden MICA/B auf. Obwohl bisher nur für T-Zellen eine Aktivierung durch die abnormale Expression beschrieben wurde, ist dies auch für NK-Zellen, die ebenfalls NKG2D exprimieren, vorstellbar [47].

Neben der direkten Beeinflussung anderer Immunzellen können NK-Zellen auch indirekt über die Freisetzung von Zytokinen die autoimmune Situation fördern oder begrenzen. So exprimieren die in die Synovialmembran infiltrierenden CD56^{bright} NK-Zellen die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6, welche an den zerstörerischen Entzündungsprozessen im Knorpelgewebe und an der Aktivierung der knochenabbauender Osteoklasten beteiligt sind [48]. Dagegen können NK-Zellen in Anwesenheit von IL-12 auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 freisetzen, welches Dendritische Zellen inhibiert und damit die Präsentation von Autoantigenen unterbinden kann [49].

Aufgrund dieser zum Teil widersprüchlichen Literaturlage, ist es sinnvoll, die humane rheumatoide Arthritis mit weiteren NK-Zell-Markern genauer zu untersuchen.

1.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten haben ebenso wie NK-Zellen ihren Ursprung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks. Die Reifung und Selektion der T-Lymphozyten erfolgt jedoch im Thymus, dem sie auch ihren Namen verdanken (T für Thymus-abhängig). Man unterscheidet verschiedene T-Zellsubgruppen, die unterschiedliche Funktionen aufweisen. T-Helfer-Zellen (Th-Zellen), die das CD4-Molekül (CD4⁺ T-Zellen) auf der Oberfläche tragen, unterstützen durch die Sekretion von Zytokinen andere Leukozyten in immunologischen Prozessen, wie z.B. der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen oder der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen. Wie bereits in Abschnitt A (Seite 2) beschrieben wurde, erkennen CD4⁺ T-Zellen Peptide über HLA-Klasse-II-Moleküle, die von APZ exprimiert werden. Innerhalb der T-Helfer-Zellen ist eine weitere funktionelle Unterteilung in Untergruppen anhand von Zytokinen möglich. Beschrieben sind Th-1, Th-2

und Th-17 Zellen, die unterschiedliche Zytokine freisetzen und damit verschiedene Arten von Immunreaktionen auslösen können. Neben den CD4⁺ T-Zellen gibt es die zytotoxischen T-Zellen (ZTL), die das CD8-Molekül auf ihrer Oberfläche exprimieren und an der Zerstörung von virusinfizierten und transformierten Zellen beteiligt sind. Sie erkennen ihre Antigenpeptide über HLA-Klasse-I-Moleküle, die von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. CD4 und CD8 fungieren, neben CD3 als Korezeptoren und erkennen zusammen mit dem T-Zellrezeptor (TZR) den jeweiligen HLA-Komplex. Der TZR ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette, wobei einige T-Zellen (5-10% der peripheren T-Zellen) einen TZR mit einer γ - und einer δ -Kette exprimieren.

Zusammen mit dem CD3-Molekül, das aus den vier invarianten γ ,- δ ,- und zwei ϵ - Ketten und mit einem zusätzlichen ζ -Ketten Homodimer besteht, bildet der TZR den T-Zell-Rezeptor-Komplex. Dabei enthält der TZR die antigenerkennende und das CD3-Molekül mit dem ζ - Ketten-Homodimer die signalübertragende Untereinheit. Nach Bindung des TZR-Komplexes an den HLA-Peptid-Komplex der Zielzelle kommt es zur Aktivierung und Proliferation der T-Zelle. T-Zellen exprimieren neben dem TZR-Komplex und den kostimulierenden Molekülen CD4 bzw. CD8 noch eine Reihe weiterer Rezeptoren, die u.a. auch auf NK-Zellen zu finden sind. So werden NKG2D, KIR- und CD94:NKG2-Rezeptoren ebenso von wenigen Subpopulationen von $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert [50].

1.3 T-Zellen im Kontext autoimmuner Gelenkerkrankungen

T-Zellen repräsentieren etwa 40% der Synovia-infiltrierenden Lymphozyten (eigene Beobachtungen). Dabei sind sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen in den Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA oder Arthritis) zu finden. Der Einfluss von T-Zellen, insbesondere von CD4⁺ T Helfer Zellen in der Pathogenese von autoimmunen Krankheiten, belegt u.a. die genetische Prädisposition durch die HLA-Klasse-II Allele HLA-DR4 und HLA-DR1 [51].

Obwohl in Mausmodellen mit Kollagen-induzierter Arthritis (KIA) und Antigen-induzierter Arthritis (AIA) nach T-Zell-Depletion mit anti-CD4 Antikörpern eine deutliche Verbesserung der Krankheitsverläufe zu beobachten ist, konnte dies nicht bei Patienten mit RA beobachtet werden, da Studien mit CD4 depletierenden Antikörpern unterschiedliche und unklare Ergebnisse hervorbrachten [52-54]. Eine Dominanz der Th1-, gegenüber den Th2-Zellen wird seit langem als mögliche Ursache für viele Autoimmunerkrankungen wie z.B. rheumatoide Arthritis und Diabetes angesehen. Dabei kommt es zu einem Überschuss an proinflammatorischen Th1- gegenüber antiinflammatorischen Th2-Zytokinen. In den letzten Jahren kam zunehmend die Frage auf, ob die Verschiebung der Th1-Th2 Balance als einzige Ursache für die Pathogenese der RA anzusehen ist. So konnte nicht erklärt werden, warum IFN- γ einerseits in der Lage ist, eine bestehende Arthritis in Mäusen zu mildern, aber

andererseits das Auftreten von Arthritis in gesunden Mäusen fördert und zum anderen die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen IFN- γ nur unzureichende Erfolge zeigte [55, 56]. Das Th1/Th2 Paradigma wurde in den letzten Jahren anhand von Studien an Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen in Tiermodellen (experimentelle Autoimmun-Encephalomyelitis und Kollageninduzierte Arthritis) um die Th17-Zellen erweitert, welche durch die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-17 als wichtige Effektorzellen postuliert werden [57, 58]. Maßgeblich beteiligt an der Th17-Differenzierung in der Maus sind die Zytokine IL-6, TGF β und IL-23, wobei letzteres ein wichtiger Überlebensfaktor für die Th17-Zellen ist. Durch die Beobachtungen, dass IL-6 oder IL-23p19 knock-out Mäuse resistent gegen die Entwicklung von Kollagen-induzierter Arthritis sind und eine Blockierung oder Überexpression von IL-17 in den Gelenken die Entzündung und Schädigung des Gelenks verhindert bzw. in anderen Modellen verschlimmert [57], wird die wichtige Funktion von Th17-Zellen deutlich. Dagegen zeigen Mäuse mit einer Deletion im Gen für IL-12, und einer damit verbundenen Abwesenheit von Th1-Zellen, verstärkte Symptome [59].

Ein weiteres wichtiges Zytokin in Entzündungsprozessen ist TNF- α , dass hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Th1-Zellen produziert wird und eine Vielzahl von Ereignissen, wie Zellproliferation, -differenzierung oder Zytokinsekretion auslöst, die im Falle einer RA, sowohl zu einer chronischen Entzündung als auch zur Zerstörung von Knochen und Knorpel führen kann.

2 Das humane CD6 Rezeptormolekül

Das Gen für CD6 ist auf Chromosom 11q13.1 lokalisiert und umspannt mehr als 25 kb. Es setzt sich aus 13, durch Introns getrennte, Exons zusammen, die ein 668 Aminosäuren (AS) langes Protein kodieren. Exon 1 und 2 kodieren für die Signalsequenz, Exon 3 bis 5 kodiert jeweils für eine 101-117 AS lange SRCR-(*engl.: Scavenger Receptor Cysteine-Rich*, SRCR I-III) Domäne und Exon 6 kodiert für einen „Spacer“, der die SRCR III-Domäne von der durch Exon 7 kodierten Transmembrandomäne trennt. Die zytoplasmatische Domäne wird von Exon 8-13 kodiert (Abbildung 5/A), deren Signaltransduktion weitgehend unerforscht ist. Für CD6 sind bisher fünf verschiedene alternative Splicevarianten beschrieben. Der Variante CD6 Δ d3 (d3 steht für SRCR III Domäne) fehlt das extrazelluläre Exon 5, während den anderen Splicevarianten Exons in der zytoplasmatischen Domäne (CD6 Δ Ex8, CD6 Δ Ex8+9, CD6 Δ Ex8+12, CD6 Δ Ex9+12) fehlen.

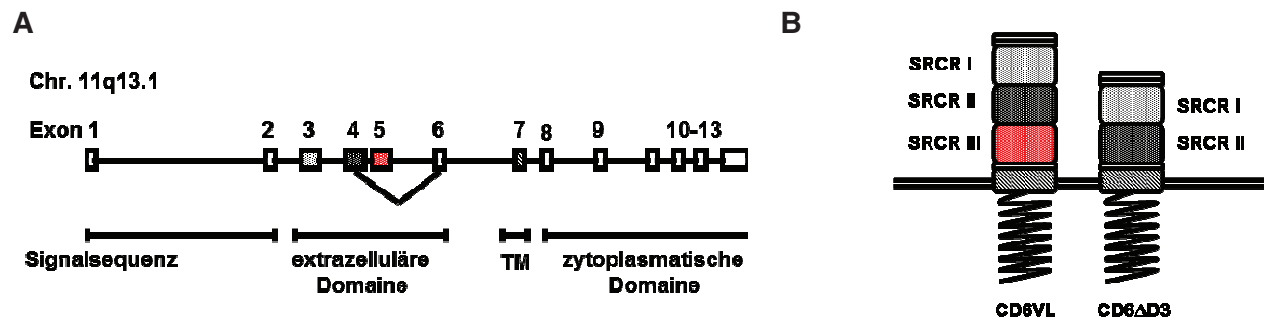


Abbildung 5: Schematische Darstellung des CD6 Gens und zwei CD6 Protein Isoformen.

Die genomische Organisation des *CD6* Gens ist in (A) gezeigt. Alle 13 Exons sind als Rechtecke dargestellt und die Introns als dünne Linie. Das rot gefüllte Rechteck stellt Exon 5 (SRCR III) dar. In (B) ist das CD6 Protein in voller Länge (links) mit den drei SRCR-Domänen dargestellt und das durch alternatives Spleißen entstandene CD6ΔD3 Protein (ohne Exon 5) mit der fehlenden SRCR III-Domäne (rechts). TM=Transmembrandomäne, SRCR= (cysteinreiche Scavenger-Rezeptoren, engl.: *scavenger receptor cysteine rich*), VL= volle Länge

Die posttranslationale Glykosylierung des Typ-B-Scavenger-Rezeptor-Glycoproteins führt zu einer Erhöhung des Molekulargewichts um 35 kDa auf 105 kDa. CD6 wird vor allem von T-Zellen (90-99%), Thymozyten und einer Subpopulation von reifen B-Zellen exprimiert [60, 61]. Für T-Zellen wurde CD6 als Molekül beschrieben, dass in der Immunologischen Synapse (IS) zwischen dem T-Lymphozyt und der APZ akkumuliert und dort an der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation beteiligt ist [62]. Nachdem beobachtet wurde, dass Antikörper gegen CD6 die Adhäsion von Thymozyten an Thymus-Epithelzellen teilweise blockieren, wird für CD6 ebenfalls eine Rolle in der Thymozyten-Reifung vermutet [63]. Ein Ligand für CD6 ist ALCAM (engl.: *activated leukocyte cell adhesion molecule*, CD166), ein zur Immunglobulin Zelladhäsionsmolekül-Superfamilie gehörender Oberflächenrezeptor. ALCAM bindet an die SRCR III-Domäne (Exon 5) von CD6 und wird auf Knochenmarks-, Stroma-, Thymusepithel-, Dendritischen-Zellen, synovialen Fibroblasten, Keratinozyten, Monozyten, T-, und B-Zellen exprimiert. Ein weiterer Ligand für CD6 ist das 3A11 Antigen, welches von humanen Thymuszellen, Synovialen Fibroblasten und Knorpelgewebe exprimiert wird und durch Kultivierung mit IFN γ erhöht werden kann [64]. Die Funktion von CD6 auf NK-Zellen ist bisher noch unbekannt und wurde im Zuge dieser Doktorarbeit untersucht.

3 Kommunikation im Immunsystem

Nachdem Pathogene in den Körper eingedrungen sind, wird von den Zellen des angeborenen Immunsystems eine akute Entzündung ausgelöst, die das Ziel hat, die Infektion lokal zu begrenzen, bis das spezifische adaptive Immunsystem seine volle Wirkung entfalten kann. Eine wichtige Funktion bei dieser Entzündungsreaktion tragen die Zytokine, zu denen beispielsweise die Interleukine, aber auch die Interferone, Tumornekrosefaktoren und verschiedene Wachstumsfaktoren gehören. Zytokine mit einer chemotaktischen Aktivität

werden als Chemokine bezeichnet. Diese werden von den Zellen am Entzündungsort sezerniert, weshalb ihre Konzentration dort auch am höchsten ist und mit zunehmender Entfernung abnimmt. Dieser Konzentrationsgradient lockt weitere Leukozyten an, die über den entsprechenden Chemokinrezeptor verfügen. Da Zytokine und Chemokine eine zentrale Rolle im Verlauf der Immunreaktion spielen, werden diese im Folgenden näher erklärt.

3.1 Zytokine

Zytokine sind kleine (etwa 25 kDa) regulatorische Proteine, die von Leukozyten und einer Reihe weiterer Zellen nach einem Aktivierungsreiz produziert werden und durch Bindung an spezifische Rezeptoren zelluläre Reaktionen auslösen. Zu den zahlreichen Funktionen von Zytokinen zählen vor allem die Stimulation der Proliferation und Differenzierung von verschiedenen Immunzellen. Ein besonderes Charakteristikum der Zytokine ist die pleiotrophe Wirkung, demnach kann ein und dasselbe Zytokin in zwei unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Reaktionen auslösen. Außerdem wird mit dem Begriff der „zytokinen Redundanz“ die Fähigkeit verschiedener Zytokine, dieselben Effekte in einer Zelle auszulösen, beschrieben. Zytokine können sowohl autokrin auf die freisetzende Zelle (z.B. aktivierte T Lymphozyten sezernieren IL-2 und fördern damit wiederum ihre Proliferation) als auch parakrin auf die umliegenden Zellen (z.B. Makrophagen sezerniertes TNF- α erhöht die Permeabilität der Gefäßendothelzellwände) wirken. Daneben wirken Zytokine aber auch auf weiter entfernt liegende Zellen, was als endokrine Wirkung bezeichnet wird. Zu der Gruppe der Zytokine gehören Interferone (IFN), Interleukine (IL-1 bis IL-37, www.genenames.org/genefamilies/IL) und Tumornekrosefaktoren (TNF). In manchen Lehrbüchern werden auch die Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF), sowie die epithelialen/endothelialen Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, FGF, PDGF, TGF) zu den Zytokinen gerechnet. Die Interferone werden weiter unterteilt in Typ-I-Interferone (IFN- α , IFN- β , IFN- τ , IFN- κ und IFN- ω), Typ-II-Interferone (IFN- γ) und Typ-III-Interferone (IFN- λ), die sich sowohl in ihrem Aufbau als auch durch ihre produzierenden Zellen unterscheiden. IFN- γ ist der einzige Vertreter der Typ-II-Interferone und strukturell nicht mit den anderen Typen verwandt. Es wird von T-Zellen und NK-Zellen, aber auch von B-Zellen und APZ sekretiert [65] und führt u.a. zur Aktivierung von Makrophagen, zur Expressionserhöhung von HLA-Klasse-I-Molekülen sowie zur Induktion von HLA-Klasse-II. Zu den Tumornekrosefaktoren gehören neben TNF- α und TNF- β auch eine Reihe weiterer Mediatoren wie die Todesrezeptor/Ligandenfamilie TRAIL oder CD95L. Die Kolonie-stimulierenden Faktoren (CSF) regulieren die Differenzierung und Proliferation von Vorläuferzellen in der Hämatopoese. Zu den CSF gehören u. a. das GM-CSF (CSF-2), das G-CSF und M-CSF (CSF-1).

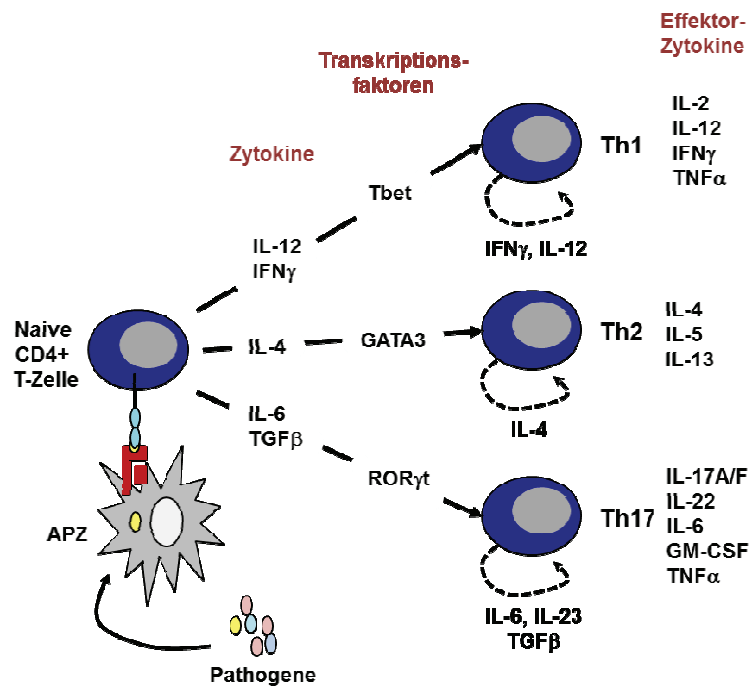


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Differenzierung von naiven CD4 T-Zellen in die Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Subpopulationen.

Nach Erkennung ihres spezifischen Antigens über den TZR reifen naive Th-Zellen, entsprechend dem lokal vorhandenen Zytokinmilieu, zu reifen Th1-, Th2-, Th17- oder Treg-Effektor-Zellen heran und produzieren die für sie charakteristischen Zytokine. Diese können wiederum auto- und parakrin auf die Th Zelldifferenzierung einwirken. APZ= Antigenpräsentierende Zelle

Neben den beschriebenen Gruppen lassen sich Zytokine auch danach einteilen, von welchen Zellen sie sezerniert werden. Am meisten verbreitet ist die Unterscheidung anhand der CD4⁺ T-Helferzellen. Diese differenzieren sich, je nach Zytokin-Stimulus, in Th1-, Th2- oder Th17-Zellen. Ausgereifte Th1-Zellen werden klassischerweise über die Produktion von IL-2, Interferon-gamma (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und über die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet definiert [66, 67]. IFN- γ kann neben der Aktivierung von z.B. Makrophagen, B-Zellen, NK- Zellen, Makrophagen und Fibroblasten in Anwesenheit von IL-12 auch autokrin zur Differenzierung von Th1-Zellen beitragen.

Für Th2-Zellen wurde hingegen die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 und die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 beschrieben [66]. IL-4 und auch IL-5 können unter anderem den Isotypwechsel von B-Zellen induzieren und eosinophile Granulozyten rekrutieren. IL-13 besitzt ähnliche Fähigkeiten und kann zudem auch Mastzellreaktionen vermitteln. Das wichtigste Zytokin für die Induktion der Th2-Differenzierung ist IL-4 [68]. Dabei kann es, ähnlich wie IFN- γ bei Th1-Zellen, für eine positive autoregulatorische Aktivierung der Th2-Zellen sorgen.

Th17-Zellen stellen eine weitere Subpopulation von Effektorzellen dar. Induziert wird ihre Differenzierung aus murinen naiven T-Zellen durch die Zytokine IL-6, TGF- β und IL-23,

wobei IL-23 zur Expansion der Th17-Zellen benötigt wird. Th17-Zellen zeichnen sich durch die Expression des TF ROR γ t und der Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-17A/F und IL-22 und auch anderer Zytokine wie IL-6, GM-CSF, TNF- α aus [68].

Unter der Bezeichnung IL-17 ist eine Familie von IL-17-Zytokinen zusammen gefasst, die sich aus IL-17A-F zusammensetzt. Dabei werden IL-17A und F von Th-17 Zellen produziert und IL-17E, das auch als IL-25 bezeichnet wird, von Th2-Zellen [68]. In der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden die Bezeichnung IL-17 für IL-17A/F verwendet. In Versuchen an Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von IL-17 zu einer Reduktion der Gelenkdestruktion führt, weshalb man Th17-Zellen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis zuschreibt [69]. Die freigesetzten Zytokine einer Th-Zell-Gruppe und ihre Transkriptionsfaktoren können die Polarisierung einer anderen Th-Zell-Gruppe in Richtung einer anderen Populationen hemmen. So können z.B. Th2-Zytokine, wie IL-4, oder der zentrale Th2-Regulator GATA3 die Th17- und Th1-Differenzierung hemmen. Das Th1-Zytokin IFN- γ und sein zentraler Regulator T-bet hemmen dagegen die Th2- und Th17-Differenzierung.

3.2 Chemokine und Migration

Chemokine sind kleine, etwa 10 kDa umfassende Polypeptide, die mit 47 strukturverwandten Mitgliedern eine weitere große regulatorische Gruppe bilden. Je nach Anzahl und Position konservierter Cysteinreste, die an der intramolekularen Bildung von Disulfidbindungen beteiligt sind, werden die Chemokine in vier Hauptgruppen unterteilt: CC, CXC, CX3C und XC [70]. Die C- und CC-Chemokine kennzeichnen sich durch ein Cystein oder zwei direkt aufeinanderfolgende Cysteine aus. Dagegen sind die Cysteine bei den CXC bzw. CX3C durch eine oder drei andere Aminosäuren (in der Nomenklatur als X gekennzeichnet) getrennt. Chemokine binden an G-Protein-gekoppelte sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren, die ebenfalls in vier Untergruppen unterteilt werden können: CCR, CXCR, CX3CR und XCR. Dabei kann ein Chemokin an mehr als einen Rezeptor binden und dieser Rezeptor wiederum an mehr als ein Chemokin.

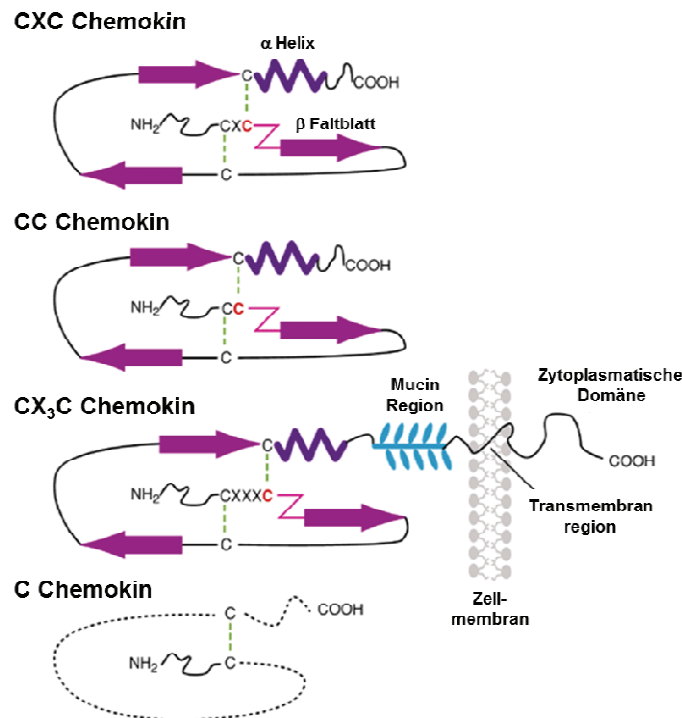


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der vier Chemokingruppen.

Dargestellt ist die Sekundärstruktur der vier Hauptgruppen von Chemokinen. Nach dem zweiten Cysteinrest (C in rot), der ersten drei Hauptgruppen folgt eine α-Helix (dunkellila Zickzack), der drei antiparallele β-Faltblätter folgen (lila Pfeile). Die CX₃C Chemokine unterscheiden sich von den anderen Chemokinen, da sie als Transmembran- oder lösliche Proteine (nicht dargestellt) auftreten können. Die Struktur der C Chemokine ist mit einer gestrichelten Linie dargestellt, da diese Struktur noch weitgehend unbekannt ist. (Abbildung modifiziert nach Mitchell J. Frederick and Gary L. Clayman, http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM3_19/S1462399401003301sup002.htm).

Eine große Rolle spielen Chemokine in der Koordination des Immunsystems. Sie regulieren beispielsweise die Migration von unreifen Lymphozytenvorläuferzellen, die Rezirkulation reifer und naiver T- und B-Zellen sowie die Rückkehr antigenspezifischer, immunkompetenter Immunzellen (engl. *homing*). Außerdem wird die Migration von APZ wie Dendritische Zellen, Makrophagen und Monozyten von Chemokinen gesteuert. Für NK-Zellen wurde ebenfalls beschrieben, dass Chemokine NK-Zellen aktivieren sowie ihr Migrationsverhalten beeinflussen können [71]. Dabei exprimieren sowohl ruhende als auch aktivierte NK-Zellen CXCR1, CXCR4 und CX3CR1 und in geringeren Mengen CXCR2 und CXCR3 [72]. Aktivierte NK-Zellen exprimieren zusätzlich die Chemokinrezeptoren CCR2, CCR4, CCR5 und CCR8 [71]. Anhand von Migrationsversuchen konnte gezeigt werden, dass ruhende NK-Zellen chemotaktisch über die Chemokine CCL2-5, CCL7-8, CX3CL1 und CXCL9-12 angelockt werden [72-74]. Die Chemokine CCL2, CCL3 und CCL5 induzieren hingegen Chemotaxis von IL-2 aktivierten NK-Zellen [75]. Die für die vorliegende Arbeit relevanten Chemokinrezeptoren, deren bindenden Chemokine und ihre Synonyme sind in Tabelle 1 zusammen gefasst.

Tabelle 1: Chemokinrezeptoren, deren bindenden Chemokine und ihre Synonyme (verändert nach [76]).

| Rezeptor | Chemokin | Synonym |
|----------|---|---|
| CCR5 | CCL3 CCL4 CCL5 CCL8 CCL11 | MIP-1 α MIP-1 β RANTES MCP-2 EOTAXIN |
| CCR6 | CCL20 | LARC |
| CCR7 | CCL19 CCL21 | MIP-3 β SLC, ECL |
| CXCR1 | CXCL1 CXCL6 CXCL8 | GRO- α GCP-2 IL-8 |
| CXCR2 | CXCL1 CXCL2 CXCL3 CXCL5 CXCL6 CXCL7 CXCL8 | GRO- α GRO- β , MIP-2 α GRO- γ , MIP-2 β ENA-78 GCP-2 CTAP3 IL-8 |
| CXCR3 | CXCL9 CXCL10 CXCL11 | MIG IP-10 IP-9 |
| CXCR4 | CXCL12 | SDF-1 α |

Neben der Aktivierung von Zellen ist die wichtigste Funktion der Chemokine die Vermittlung der Zelladhäsion und Migration von Zellen in immunologischen Prozessen wie der Embryonalentwicklung, Zelldifferenzierung, Entzündungsvorgängen und Wundheilung. Dabei ist die Transmigration von Leukozyten (LZ) ein aus mehreren Phasen bestehender Prozess bei dem die Leukozyten in der Lage sind, das Blut- oder Lymphgefäßsystem an genau definierten Stellen zu verlassen. Dabei sind sowohl die Oberflächenmoleküle und die sezernierten Chemokine der Endothelzellen (EZ) sowie die Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der LZ von entscheidender Bedeutung.

Während der ersten Phase der Extravaskularisation (Austritt aus dem Gefäßsystem) binden die LZ über ihre Oberflächenoligosaccharide (z.B. CD44, CD15s und *Carcinoembryonic Antigen*) an die Adhäsionsmoleküle E- und P-Selektin, wodurch es zu einem "Abbremsen" in ihrer Bewegung kommt (Abbildung 8/1 und 2). Neben den EZ besitzen auch LZ Selektine (L-Selektin), über die sie zuckerhaltige Proteine oder P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL1) auf der Oberfläche von EZ binden können. Die Bindung der LZ über die Selektine bedarf einer ständigen Strömung über das Endothel. Bricht diese Flussbewegung ab, löst sich die Bindung zwischen den Zellen [77]. Im Folgenden kommt es zu einem langsamen Rollen der LZ entlang der Endothelschicht (Abbildung 8/3), wodurch es zu einer Konformationsänderung der Integrine kommt (Adhäsionsmoleküle auf den LZ). Dabei wird die Bindungsfestigkeit zwischen LZ und EZ erhöht und es kommt zu einem Abflachen der LZ

(Abbildung 8/4 und 5) [78]. Durch die Bindung werden in beiden Zellen Signalkaskaden ausgelöst und Chemokine sezerniert, welche wiederum aktivierend auf andere Zellen wirken. Gefolgt wird dies von dem sogenannten „intravaskulären Kriechen“, welches ebenfalls durch Integrine vermittelt wird (Abbildung 8/6). Die Transmigration (Diapedese) der Leukozyten kann nun entweder parazellulär durch Spalten zwischen den EZ, oder transzellulär durch die Endothelzellen hindurch erfolgen (Abbildung 8/7). Abschließend passieren die Leukozyten die semipermeable Perizytenhülle und die Basalmembran wird mit Hilfe von Proteasen permeabilisiert und durchwandert.

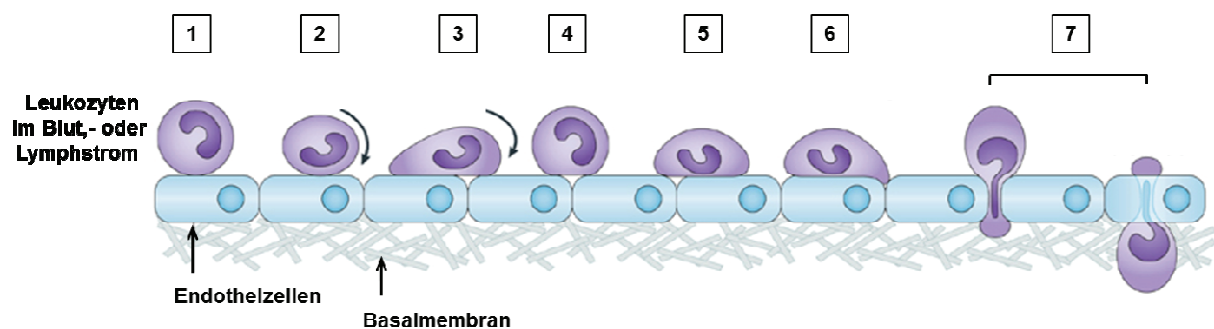


Abbildung 8: Schematischer Ablauf der Leukozyten-Adhäsionskaskade.

1. Annäherung; 2. Abbremsen aus dem Blutstrom; 3. langsamer werdendes Rollen; 4. Adhäsion; 5. Verstärkung der Bindung; 6. intravaskuläres Kriechen; 7. parazelluläre oder transzelluläre Transmigration und Wanderung durch die Basalmembran und die Perizytenhülle (Diapedese). Die Aktivierung durch Chemokine geschieht während Phasen 2 bis 4. (Modifiziert nach [78])

4 Autoimmune und nicht-autoimmune Gelenkerkrankungen

In der vorliegenden Arbeit wurden NK-Zellen im Kontext von autoimmunen versus nicht-autoimmunen Gelenkerkrankungen untersucht. Dazu wurde Synovialflüssigkeit (SF) und Blut von Patienten mit der autoimmunen Gelenkerkrankung Rheumatoider Arthritis (RA) und der nicht-autoimmunen Gelenkerkrankung Arthrose analysiert und gegenübergestellt. Die NK-Zell-Verteilung im synovialen Gewebe der Arthrose-Patienten konnte ebenfalls untersucht werden, da dies im Zuge einer Knie totalendoprothese (Implantation eines künstlichen Kniegelenks, K-TKP) entnommen wurde (Abbildung 9).

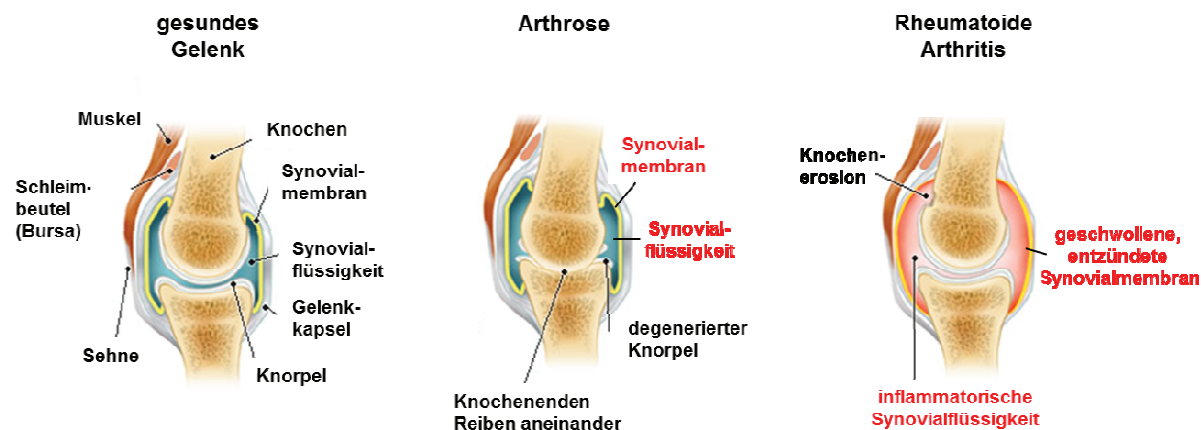


Abbildung 9: Aufbau eines Kniegelenks und die Veränderungen bei Arthrose und rheumatoider Arthritis.

Das Kniegelenk ist umgeben von einer Gelenkkapsel und der Synovialmembran. Für eine reibungslose Bewegung sind die Knochen von einer Gelenkknorpelschicht überzogen und von der Synovialflüssigkeit (Gelenkflüssigkeit), die aus dem Schleimbeutel stetig in das Gelenk abgegeben wird, umgeben. Die Sehnen und Muskeln stabilisieren das Gelenk. Bei einer Arthrose ist die Gelenkzerstörung mechanisch bedingt und führt dadurch zu einer Abnutzung des Knorpel- und Knochengewebes. Die Arthritis ist dagegen eine Autoimmunkrankheit, bei der eine entartete Immunantwort mit einer starken Leukozyten-Infiltration einhergeht und damit zu einem Anschwellen der Synovialmembran bzw. einer Anreicherung der Synovialflüssigkeit führt. Die rot gekennzeichneten Kompartimente standen neben Blut von Patienten und gesunden Spendern in dieser Arbeit zur Verfügung. Modifiziert nach <http://www.mobilitychoices.co.uk/glossarypage.php?uid=47&start=R>

4.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA oder Arthritis) ist eine systemisch, chronisch verlaufende Autoimmunkrankheit, welche vor allem die Gelenke befällt und zu fortschreitender Zerstörung der Knorpel und Knochen führt [79]. Weltweit sind 0,5-1% der Bevölkerung davon betroffen, wobei die Krankheit bei Frauen deutlich häufiger auftritt als bei Männern. Obwohl die Ursachen noch nicht geklärt sind, wird angenommen, dass sowohl Infektionen als auch genetische Faktoren einen Einfluss auf die Entstehung der Erkrankung haben [80].

Eine Variante rheumatoide Arthritis zu diagnostizieren, ist der Nachweis von Autoantikörpern die sich gegen citrullinierte Proteine (*engl. anti citrullinated protein antibodies, ACPA*) oder gegen die Fc-Fragmenten der körpereigenen IgG-Antikörper (Rheumafaktoren) im Blut der Patienten [81] richten. Jedoch haben nicht alle Patienten mit RA-Symptomen diese Autoantikörper, weshalb sich eine Diagnose nach wie vor auf standardisierte Klassifikationskriterien stützt, die eine Zählung und Lokalisation schmerzhafter, geschwollener und überwärmter Gelenke umfasst (RA-Verdachtskriterien der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh)).

Trotz vieler Bemühungen konnte die genaue Pathogenese der rheumatoiden Arthritis bis heute nicht abschließend geklärt werden. Umwelt- und genetische Faktoren scheinen eine Rolle bei der Entstehung der RA zu spielen.

Charakteristisch für die Erkrankung ist ein invasives Wachstum der entzündeten Synovialmembran wodurch es zu einer Pannusbildung (Bindegewebswucherung) kommt, dem eine zunehmende Gefäßbildung (Angiogenese) einher geht, durch die eine Versorgung

mit Sauerstoff und Nährstoffen erfolgen kann [82]. Zudem ermöglicht sie die unkontrollierte Migration weitere Immunzellen wie Makrophagen, DC, B-Zellen, CD4/CD8 T-Zellen, Mastzellen und NK-Zellen [83]. Das invasive Pannuswachstum führt im Verlauf der Erkrankung zur Destruktion des umliegenden Knorpel- und Knochengewebes. Unter normalen Bedingungen ist der Knochenstoffwechsel ein Prozess, der einem ständigen Knochenauf- und abbau unterliegt, welcher hauptsächlich durch Osteoblasten und Osteoklasten bewerkstelligt wird. Osteoblasten produzieren Stoffe, die an der Knochenbildung beteiligt sind (z.B. Kalziumphosphat, Kollagen). Dagegen ist es Aufgabe der Osteoklasten, den Knochen als Reaktion auf Belastungsanpassungen ab- bzw. umzubauen. Osteoklasten entstehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen der myeloischen Reihe, wobei Zytokine wie M-CSF (macrophage colony stimulating factor) und RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand), die von Osteoklasten oder auch NK-Zellen gebildet werden [44], ihre Differenzierung unterstützen. Aber auch andere Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF- α und Prostaglandin E, die im Rahmen der RA vor allem von Makrophagen gebildet werden, verstärken die Osteoklasten-Differenzierung.

Historisch wurde die Arthritis zunächst als Th1-Krankheit beschrieben, da in vitro Versuche eine starke Makrophagen-stimulierende Funktion von IFN- γ zeigen konnten.

In den letzten Jahren wurde jedoch den Th17-Zellen eine wichtigere Rolle in der Regulation der RA zugeschrieben. Sowohl Th1- (TNF- α) als auch Th17-Zellen (IL-17, IL-22) sezernieren Zytokine, die wiederum zu einer erhöhten Proliferation der synovialen Fibroblasten und Osteoklasten beitragen [58, 84, 85].

4.2 Arthrose

Bei Arthrosen handelt es sich um langsam progrediente, primär nichtentzündliche, degenerative Gelenkerkrankungen mit Zerstörung des Gelenkknorpels, anderer Gelenkanteile und sekundärer Knochenläsion (Herold G., Innere Medizin, 2011). Laut dem Robert-Koch-Institut zählen Arthrosen zu den weltweit häufigsten Gelenkerkrankungen (www.rki.de). Als Ursache gelten neben genetischen Veranlagungen und angeborenen Deformitäten (z. B. Achsenfehlstellungen, Hüftgelenkdysplasien) auch Verletzungen und Unfälle, Überbeanspruchung durch starkes Übergewicht oder Leistungssport. Die Arthrose kann prinzipiell an jedem Gelenk auftreten, jedoch sind Knie, Hände, Hüfte und Wirbelsäule die am häufigsten betroffenen Regionen.

Die starken mechanischen Belastungen des Gelenkknorpels führen dazu, dass die Oberfläche des Knorpels degeneriert und im weiteren Verlauf zu Veränderungen am Knochen führt. Dies wird durch die Proliferation des Bindegewebes und der Chondrozyten (Knorpelzellen) verursacht, die zur Bildung von Geröllzysten (nekrotisches Knorpel- und

Knochengewebe) und Osteophyten (Neubildungen am Knochen) führt. Obwohl Arthrosen medizinisch gesehen nicht als entzündliche Erkrankung angesehen werden, finden sich dennoch proinflammatorische Zytokine und Immunzellen in der Synovialflüssigkeit, weshalb immunologisch gesehen dennoch eine Entzündung vorliegt.

5 Aufgabenstellung

NK-Zellen können eine Immunantwort sowohl direkt, über ihre zytotoxische Effektorfunktion, als auch indirekt über die Freisetzung von Zytokinen beeinflussen. Dabei ist gerade für Autoimmunerkrankungen nicht klar, welche NK-Zell-Subpopulationen an der Entstehung und Aufrechterhaltung dieses entzündlichen Prozesses beteiligt sind.

Aufgrund der Expressionsdichte von CD56 und CD16 lassen sich NK-Zellen aus dem Blut gesunder Spender in $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ und $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ Zellen unterteilen. In unserer Arbeitsgruppe wurde mit dem bisher nur auf T-Zellen beschriebenen *scavenger*-Rezeptor CD6 ein neuer differenzieller Marker identifiziert, welcher auf einer Subpopulation der $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ NK-Zellen, nicht aber auf $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ NK-Zellen exprimiert wird. Da die funktionelle Relevanz dieses Markers für NK-Zellen weitgehend unbekannt ist, sollte diese im Vergleich zu anderen NK-Rezeptoren, anhand von NK-Zellen aus dem Blut gesunder Spender untersucht werden.

Die zweite Aufgabenstellung dieser Arbeit war es die Rolle der NK-Zellen im Entzündungsprozess der rheumatoiden Arthritis zu bestimmen. Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass in der Synovialflüssigkeit (Gelenkflüssigkeit) von Patienten mit rheumatoider Arthritis eine zum Blut umgekehrt proportionale Verteilung der NK-Subpopulationen vorliegt, die zu einer Anreicherung der $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ Population führt. Deshalb sollte zunächst die CD6 Expression dieser synovialen NK-Zellen, im Vergleich zu den aus der Peripherie untersucht werden. Da die beiden NK-Subpopulationen ein unterschiedliches Chemokinrezeptor-Repertoire aufweisen, sollt hier außerdem der Frage nachgegangen werden, inwieweit Chemokine an der selektiven Infiltration der $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ NK-Zellen beteiligt sind und welchen Beitrag NK-Zellen durch ihre rezeptorvermittelte Zytokin/Chemokin Freisetzung im Entzündungsprozess der rheumatoiden Arthritis leisten.

C. Material

1 Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---|----------------------------|
| Multiplex Array System - Bio-Plex 200 (Luminex Technologie) | Bio-Rad |
| Durchflusszytometer, LSRIITM | BD Biosciences |
| Einfrierbox | Nalgene |
| Eismaschine AF-30 | Scotsman |
| Elektrophoresekammer | Invitrogen |
| Gefrierschrank, -20 °C | Liebherr |
| Gefrierschrank, -80 °C | Heraeus |
| Geldokumentationssystem, Syngene | VWR International |
| Heizblock Thermostat 5320 | Eppendorf |
| Heizplatte mit Magnet | IKA-Labortechnik |
| Inkubationsschrank | Heraeus |
| Kühlschränke, 4 °C | Liebherr, Eppendorf |
| Magnet (DynaMAG-15, VarioMACS) | Dynal/Invitrogen, Miltenyi |
| Mehrkanalpipetten (25 - 200 µl) | Buddeberg |
| Mikropipetten (0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000µl) | Buddeberg |
| Mikroskop | Hund |
| Mikrowelle | SHARP |
| Millipore-Wasser Anlage Milli-Q | Millipore |
| Neubauerzählkammer | Hecht-Assistent |
| pH-Messgerät | WTW |
| Pipettierhilfe Pipetus-Akku | Hirschmann |
| PCR-Gerät | Whatman Biometra |
| Rollmischer | Kisker Biotech |
| Schüttler | Biotec-Fischer |
| Spannungsgerät LK3 GPS 200/400 | Pharmacia |
| Spektralphotometer | Amersham Biosciences |
| Sterilwerkbank | BDK Luft- und Klimatechnik |
| Stickstofftank Chronos Biosafe | Messer Griesheim |
| Stoppuhr | NeoLab |
| Tischzentrifuge | Heraeus |
| Vortexer VF2 | IKA-Labortechnik |
| Analysewaage | Mettler PC440 |
| Präzisionswaage | Mettler AE166 |
| Wasserbad | GFL |
| Kühlzentrifuge | Heraeus |

2 Chemikalien

| Chemikalien | Firma |
|----------------------------|-------|
| Ammoniumchlorid | Roth |
| Bromphenolblau | Sigma |
| BSA (bovines Serumalbumin) | Roth |

| | |
|--------------------------------------|-------------|
| DEPC (Diethylpyrocarbonat) Wasser | Sigma |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Sigma |
| DNase (D 4263) | Sigma |
| DTT (Dithiothreitol) | Invitrogen |
| EDTA (Ethyldiamintetraacetat) | Sigma |
| Ethanol | Merck |
| Ethidiumbromid | Invitrogen |
| Ficoll, Biocoll Separationslösung | Biochrom AG |
| CXCL1 (GRO- α) | Immunotools |
| Hyaluronidase Type V (H 6254) | Sigma |
| Heparin | Braun |
| Ionomycin, Kalziumsalz | Sigma |
| Isopropanol (2-Propanol) | Sigma |
| IL-2, rekombinant, human (Proleukin) | Ceutus |
| CXCL8 (IL-8) | Immunotools |
| IL-15 | PromoCell |
| CXCL10 (IP-10) | Immunotools |
| Kaliumhydrogencarbonat | Roth |
| Kollagenase Typ IV (C 5138) | Sigma |
| Magnesiumchlorid | Sigma |
| Natrium-Azid | Sigma |
| PBS (Phosphat-gepufferte Saline) | Invitrogen |
| Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) | Sigma |
| Paraformaldehyd | Merck |
| CCL5 (RANTES) | Immunotools |
| Saponin | Roth |
| CXCL12 (SDF-1 α) | Immunotools |

3 Verbrauchsmaterial

3.1 Zellkultur

Plastik- und Glaswaren

| Bezeichnung | Firma |
|---|-------------|
| Einfrierröhrchen | Nunc |
| Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) | Falcon |
| Lumaplaten | PerkinElmer |
| Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²) | Falcon |
| Zellkulturplatten (6-Loch, 24-Loch, 96-Loch) | Falcon |

Lösungen, Medienzusätze und Verbrauchsmedien

| Bezeichnung | Firma |
|---|-----------------|
| DMEM | Cambrex |
| Erylyse-Puffer (10x): 155mM Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl), 100mM Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃), 1mM EDTA, Wasser, pH= 7,3 Vor Gebrauch in H ₂ O verdünnt und sterilfiltriert | Labor C.S. Falk |
| FACS-Flow | BD Biosciences |
| FACS-Puffer: PBS, 0,1% NaN ₃ , 5% FBS | Labor C.S. Falk |

| | |
|--|--|
| FACS-Rinse | BD Biosciences |
| FACS-Clean | BD Biosciences |
| FBS (Fötale Kälberserum) | Invitrogen |
| Humanserum | Labor C.S. Falk |
| Kompensations-Beads (CompBeads™) | BD Biosciences |
| L-Glutamin 200 mM | Invitrogen |
| MEM (Nicht-essentielle Aminosäuren) 100x | Invitrogen |
| Natriumpyruvat 100mM | Invitrogen |
| Negativ-Isolationskit für NK-Zellen und T-Zellen | Miltenyi Biotec oder Dynal – Invitrogen, |
| Penicillin/ Streptomycin (P/S) | Invitrogen |
| RPMI 1640 | Invitrogen |
| Trypanblaulösung (0,4% in physiolog. Saline) | Invitrogen |
| Trypsin/EDTA-Lösung (10x in PBS lösen) | Sigma |

Medien

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---------------------------------------|---|
| RPMI III | RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 100 U/ml P/S 1 mM Natriumpyruvat |
| TM - Medium (Tumuormedium) | RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 100 U/ml P/S 1 mM Natriumpyruvat 1 x MEM 10% FBS |
| NKL- Medium | RPMI III 15% FBS 100 U/ml IL-2 5% TCGF |
| Einfrier - Medium | RPMI III 10% DMSO 50% FBS |
| NK-Zell - Medium | RPMI III 10% Human Serum 500 U/ml IL-2 |

Verbrauchsmaterial Allgemein

| Bezeichnung | Firma |
|--|--------------------|
| FACS-Röhrchen | Greiner |
| Einmalküvetten | Eppendorf |
| Glasware (Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Messbecher, -zylinder) | Schott Duran |
| Reaktionsgefäße (0,2 ml) | Sarstedt |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml) | Greiner, Eppendorf |
| Rührfische | NeoLab |
| Skalpelle | Braun |
| Spitzen, Kanülen | BD, Braun |

3.2 Multiplex-Analysen

Zytokinbestimmung

| Bezeichnung | Firma |
|--|-----------|
| Bio-Plex Pro Zytokin Reagenzien Kit | Bio-Rad |
| Humaner 27-Plex (IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, EOTAXIN, FGF basic, G-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF bb, RANTES, TNF- α , VEGF) | Bio-Rad |
| Humaner 23-Plex (CTACK-CCL27, GRO- α , HGF, ICAM-1, IFN- α 2, IL-3, IL-12p40, IL-16, IL-18, LIF, MCP-3 CCL7, M-CSF, MIF, MIG, β -NGF, SCF, SCGF β , SDF-1 α , TNF- β , TRAIL, VCAM-1, IL-1 α) | Bio-Rad |
| Humaner 10-Plex (GRO- α , IL-2R α , IL-12p40, LIF, MIF, MIG, SCGF- β , SDF-1 α , TRAIL) | Bio-Rad |
| Humaner 15-Plex (IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α) | Bio-Rad |
| 96-Loch-Filterplatten | Millipore |
| Serum Diluent Human | Bio-Rad |
| Bio-Plex Kalibrierungskit | Bio-Rad |

3.3 Zellmigrations Versuch

| Bezeichnung | Firma |
|---|-----------------|
| Transwellssystem #3421 | Corning, Costar |
| Companion Platte | BD Biosciences |
| Zellkultureinsätze für 24 Loch-Format (3 μ m) | BD Biosciences |

3.4 Molekularbiologie

RNS-Isolierung

| Chemikalien | Firma |
|----------------------------|--------|
| RNeasy Mini Kit (50 Tests) | Qiagen |

Reverse Transkription

| Chemikalien | Firma |
|---------------------------|------------|
| dNTP-Mix, 10 mM | Invitrogen |
| DTT, 0,1 M | Invitrogen |
| 1st strand buffer 5x | Invitrogen |
| Oligo dT Primer 0,5 mg/ml | Invitrogen |
| Superscript II 200 U/ml | Invitrogen |
| DEPC Wasser | Sigma |

Primer

| Spezifität | Sense Primer (5'-3') | Antisense Primer (5'-3') | Länge (bp) |
|------------|----------------------------------|----------------------------------|---|
| β-Aktin | TGACGGGGTCACCCAC | CTAGAAGCATTTGCGG | 662 |
| CD6ΔD3 | (5'dD3_2) GGATCAGTGTGCGATGACA | (3'_CD6_D) GAGGAGGTCCAGCAAAGC | VL = 1008 ΔEx8 = 912 ΔEx5 = 705 ΔEx5+8 = 609 |

VL=volle Länge

PCR Reagenzien

| Chemikalien | Firma |
|---|------------|
| dNTP 10 mM aus dATP, dTTP, dGTP, dCTP je 2,5 mM | Invitrogen |
| PCR Puffer, ohne Mg ²⁺ | Invitrogen |
| Tag DNS Polymerase 5 U/ml | Invitrogen |
| Magnesiumchlorid (50 mM) | Invitrogen |
| PCR Wasser bidest. | Invitrogen |

Gelelektrophorese

| Chemikalien | Firma |
|----------------------|------------|
| TAE-Puffer 50x | Invitrogen |
| Agarose SeaKem | BMA Biozym |
| 1 kb Plus DNS Leiter | Invitrogen |
| Ladepuffer (6x) | Fermentas |

DNS Isolierung aus Gel

| Chemikalien | Firma |
|-----------------------------|--------|
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen |

3.5 Allgemein

| Bezeichnung | Firma |
|--|---------------------|
| Einmalküvetten | NeoLab |
| FACS-Platten | Greiner |
| FACS-Röhrchen | Greiner |
| Glasware | Schott Duran |
| Handschuhe | Kimberly-Clark |
| Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl) | Corning |
| Pipettenspitzen, gestopft (10, 200, 1000 µl) | Starlab |
| Reaktionsgefäße (0,2 ml) | Sarsted |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml) | Greiner, Eppendorff |
| Spritzen, Kanülen | BD; Braun |
| Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) | Falcon; Greiner |

4 Zellen

4.1 Zelllinien

| Zelllinie | Beschreibung | Medium | Herkunft |
|-----------|---|--------|---------------|
| Daudi | Burkitt-B-Zelllymphom, homozygote β -m-Deletion | TM | ATCC |
| K-562 | Erythroleukämiezelllinie, HLA-Klasse-I-negativ | TM | ATCC |
| L721.221 | EBV-transformierte B-Zelllinie, HLA-Klasse-I-negativ | TM | D. Schendel |
| NKL | NK-Leukämiezelllinie | NKL-M | M.Lopez-Botet |

Verschiedene Varianten der EBV-transformierten B-Zelllinie L721 wurden nach Bestrahlung auf den Verlust der HLA-Klasse-I- bzw. II-Expression selektioniert, wodurch u.a. die Subzelllinie L721.221 entstand. Die L721.221-Linie zeichnet sich durch große Deletionen in beiden auf Chromosom 6 kodierten HLA-Klasse-I-Regionen aus und exprimiert daher keine HLA-Klasse-I-Moleküle [86]. Die Erythroleukämiezelllinie K-562 exprimiert gemäß ihrem Differenzierungsstadium keine HLA-Klasse-I-schweren Ketten. Von einem 16 Jahre alten männlichen Patienten mit Burkitt Lymphom wurde die B-lymphoblastoide Zelllinie Daudi durch E. Klein and G. Klein (1967) etabliert. Die Zelllinie ist ebenfalls HLA-Klasse-I negativ, obwohl HLA-Klasse-I intrazellulär vorhanden ist. Durch eine Mutation im β 2-m Gen kann von der ausreichend vorhandenen β 2-m-mRNA keine Proteinsynthese stattfinden [87].

5 Blut- und Synovialflüssigkeitsproben

| | | | |
|------------|-----------------------|-----------|----------------------------------|
| SF | Synovialflüssigkeit | OA | Oligoarthritis |
| RA | Rheumatoide Arthritis | PA | Polyarthritis |
| ReA | Reaktive Arthritis | ? | unklare oder unbekannte Diagnose |

5.1 Arthritis-Patienten

Tabelle 2: Arthritis-Patienten - Synovialflüssigkeit (SF/SFMC) und Blut (Plasma/PBMC)

| Patienten# | Geschlecht | SF | Blut | Diagnose |
|------------|------------|----|------|--------------------------------|
| SYN#01 | M | x | x | ReA |
| SYN#02 | ? | x | | ? |
| SYN#03 | W | x | x | RA |
| SYN#04 | W | x | | Undifferenzierte OA (ReA?) |
| SYN#05 | W | x | | RA |
| SYN#06 | W | x | | Undifferenzierte OA (RA? ReA?) |
| SYN#07 | ? | x | | ? |
| SYN#08 | W | x | x | RA |
| SYN#09 | W | x | | RA |
| SYN#11 | W | x | x | RA |
| SYN#12 | W | x | x | RA |

| | | | | |
|----------------------|---|---|---|---------------------|
| SYN#13 | M | x | x | RA |
| SYN#14 | W | x | x | RA |
| SYN#15 | W | x | | ReA |
| SYN#16 | W | x | | Undifferenzierte PA |
| SYN#17 | M | x | x | Undifferenzierte OA |
| SYN#20 | M | x | x | RA |
| SYN#21 | M | x | | ? |
| SYN#22 | W | x | x | RA |
| SYN#23 | W | x | x | Undifferenzierte PA |
| SYN#24 | W | x | x | RA |
| SYN#25 | W | x | x | ? |
| SYN#26 | M | x | | ? |
| SYN#27 | W | x | | ? |
| SYN#28 = RA87 = RA88 | W | x | | Psoriasisarthritis |
| SYN#29 = RA80 | W | x | | RA |
| RA#89 | W | x | x | RA |
| RA#90 | W | x | x | PA |
| RA#91 | W | x | x | PA |
| RA#92 | W | x | | ? |
| RA#95 | M | x | | PA |
| RA#96 | M | x | | ? |
| RA#97 | ? | x | | ? |
| RA#98 | ? | x | | ? |
| RA#99 | W | x | | ? |

5.2 Arthrose-Patienten

TEP Totalendoprothese

Tabelle 3: Arthrose-Patienten - Synovialflüssigkeit, Blut und Gewebe

| Patienten# | Geschlecht | SF | Blut | Plasma | Gewebe | Diagnose |
|------------|------------|----|------|--------|--------|-------------|
| TEP 40 | W | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP 41 | W | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP 23 | M | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP 24 | M | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP RJ | M | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP AS | W | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP MB | W | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP MS | W | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP 3 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 4 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 6 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 7 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 8 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 9 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 10 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 11 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 14 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 15 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 16 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 17 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 23 | W | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 1 | M | x | | x | | Gonarthrose |

| | | | | | | |
|----------|---|---|---|---|---|-------------|
| TEP 5 | M | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 7 | M | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 8 | M | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 19 | M | x | | x | | Gonarthrose |
| TEP 39 | W | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP LR | W | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP VW | M | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP SN | M | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP RC | W | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP JN | W | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP LB | W | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP HB | W | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP SR | M | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP GA | W | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP WH | M | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP KK | W | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP WU | W | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP SS | M | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP BA | W | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP OH | M | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP FE | W | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP JG | W | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP SP | M | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP TE | W | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP LJ | M | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP NE | M | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP CS | M | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP RC | M | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP AO | M | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP SKH | M | x | x | | x | Gonarthrose |
| TEP #93 | ? | x | x | | | Gonarthrose |
| TEP #100 | W | x | x | | x | Gonarthrose |

5.3 Normalspender

Tabelle 4: Normalspender - Serum und Blut

| NS# | Geschlecht | Plasma | Blut |
|-----|------------|--------|------|
| SM | M | x | |
| FM | M | x | |
| TL | W | | x |
| TR | M | x | x |
| PR | M | x | x |
| DtM | M | | x |
| GA | M | x | x |
| WG | M | x | x |
| KK | M | x | x |
| BJM | W | x | x |
| MP | M | | x |
| AC | M | x | x |
| CF | W | | x |

6 Antikörper

6.1 Primärantikörper

| Spezifität | Konjugation | Isotyp | Klon | Einsatz/Konz. | Hersteller |
|-----------------------|-----------------|--------|-------------|------------------|-------------|
| Isotypkontrolle | keine | IgG1 | MOPC21 | FACS/ 5 µg/ml | Sigma |
| Isotypkontrolle | keine | IgG2a | UPC10 | FACS/ 5 µg/ml | Sigma |
| Isotypkontrolle | keine | IgM | MOPC104E | FACS/ 5 µg/ml | Sigma |
| Isotypkontrolle | FITC | IgG2b | MOPC19 | FACS/ 2 µl | BD |
| Isotypkontrolle | PE | IgG2a | 7T4-1F5 | FACS/ 2 µl | BC |
| Isotypkontrolle | PerCP | IgG2a | X39 | FACS/ 2 µl | BD |
| Isotypkontrolle | APC | IgG2a | X39 | FACS/ 2 µl | BD |
| Isotypkontrolle | Pacific Blue | IgG2a | G155-178 | FACS/ 2 µl | BD |
| CCR5 (CD195) | Alexa Fluor 647 | IgG2a | HEK/1/85a | FACS/ 2 µl, 37°C | BioLegend |
| CCR6 (CD196) | Alexa Fluor 647 | IgG2b | TG7/CCR6 | FACS/ 2 µl, 37°C | BioLegend |
| CCR7 (CD197) | Alexa Fluor 647 | IgG2a | TG8/CCR7 | FACS/ 2 µl, 37°C | BioLegend |
| CXCR1 (IL-8RA, CD181) | APC | IgG2b | 8F1/CXCR1 | FACS/ 2 µl, 37°C | BioLegend |
| CXCR2 (IL-8RB, CD182) | Alexa Fluor 647 | IgG1 | 5E8/CXCR2 | FACS/ 2 µl, 37°C | Bio Legend |
| CXCR3 (CD183) | Alexa Fluor 647 | IgG1 | TG1/CXCR3 | FACS/ 2 µl, 37°C | Bio Legend |
| CXCR4 (SDF-1R, CD184) | APC | IgG2a | 12G5 | FACS/ 2 µl, 37°C | BioLegend |
| CD3 | FITC | IgG1 | UCHT1 | FACS/ 2 µl | BC |
| CD6 | PE | IgG1 | M-T605 | FACS/ 2 µl | BD |
| CD6 | PE, APC, keine | IgG1 | M-T411 | FACS/ 2 µl | Miltenyi B. |
| CD6 | Keine | IgG1 | MEM-98 | FACS/Stimulation | BioLegend |
| CD6 | Keine | IgG1 | CD6BL | FACS/Stimulation | BioLegend |
| CD6 | Keine | IgG2b | M-T606 | FACS/Stimulation | Baxter |
| CD16 | FITC, keine | IgG1 | 3G8 | FACS/Stimulation | BC |
| CD25 | FITC | IgG2a | B1.49.9 | FACS/ 2 µl | BC |
| CD45RA | FITC | IgG1 | ALB11 | FACS/ 2 µl | BC |
| CD45RO | PE | IgG2a | UCHL1 | FACS/ 2 µl | BC |
| CD56 | APC, PE | IgG1 | NKH-1 | FACS/ 2 µl | BC |
| CD56 | ECD | IgG1 | N901 | FACS/ 2 µl | BC |
| CD56 | AF 700 | IgG1 | NKH-1 | FACS/ 2 µl | BC |
| CD94 | FITC, PE | IgG1 | HP-3D9 | FACS/ 2 µl | BD |
| CD107a | FITC, PE | IgG1 | H4A3 | Degranulat./10µl | BD |
| CD166 (ALCAM) | PE | IgG1 | 3A6 | FACS/ 2 µl | BC |
| CD226 (DNAM1) | keine | IgG1 | DX11 | Stimulation | BD |
| CD244 (2B4) | keine | IgG1 | C1.7.1 | Stimulation | Immunotec |
| HLA-Klasse-I | keine | IgG2a | W6/32 | FACS/ Hybridom | J.Johnson |
| IL-17 | Alexa Fluor 488 | IgG1 | eBio64DEC17 | FACS/ 8 µl | eBioscience |
| IL-22 | APC | IgG1 | 142928 | FACS/ 8 µl | R&D |
| CXCL10 (IP-10) | PE | IgG1 | 33036 | FACS/ 4 µl | R&D |
| IFN-γ | PE | IgG1 | B27 | FACS/ 2 µl | BD |
| IFN-γ | FITC | IgG1 | B27 | FACS/ 2 µl | BD |
| TNF-α | Alexa Fluor 647 | | MAb11 | FACS/ 4 µl | BioLegend |

| | | | | | |
|-------|-----------|-------|--------|------------------|-----|
| NKG2A | PE | IgG2b | Z177 | FACS/ 2 µl | BC |
| NKG2C | keine | IgG1 | 134591 | Stimulation | R&D |
| NKG2D | PE, keine | IgG1 | 149810 | FACS/Stimulation | R&D |
| Nkp30 | PE, keine | IgG1 | Z25 | FACS/Stimulation | BC |
| Nkp44 | PE, keine | IgG1 | Z231 | FACS/Stimulation | BC |
| Nkp46 | PE, keine | IgG1 | BAB281 | FACS/Stimulation | BC |

BD: BD Biosciences, BC: Beckman Coulter

6.2 Sekundärantikörper

| Spezifität | Konjugation | Organismus | Einsatz | Hersteller |
|--|-------------|------------|----------|------------------------|
| αMaus-IgG | PE | Ziege | 1:100 | Jackson ImmunoResearch |
| αMaus-IgG/M | PE, FITC | Ziege | 1:100 | Jackson ImmunoResearch |
| αMaus-IgG F(ab') ₂ -Fragment | keine | Ziege | 20 µg/ml | Beckman Coulter |

7 Firmenverzeichnis

| | |
|--|---|
| Agfa-Gevaert, Leverkusen | Invitrogen/Life Technologies, Karlsruhe |
| Alexis, Laufelingen, Schweiz | Julabo, Seelbach |
| Amersham, Little Chalfont, England | Leica, Wetzlar |
| ATCC, Rockville, Maryland, USA | Liebherr, Biberach an der Riss |
| Atomic Energy of Canada, Ontario, Kanada | Merck, Darmstadt |
| Avidity, Denver, USA | Messer Griesheim, Krefeld |
| Bayer, Health Care, West Haven CT | Mettler, Gießen |
| BDK Luft- u Reinraumtechnik, Sonnenbühl | Millipore, Bradford, Massachusetts, USA |
| Beckman Coulter/Immunotech, USA | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| BD Biosciences (BD), USA | Nalgene, Rochester, New York, USA |
| Bibby Dunn Labortechnik, Asbach | NeoLab, Heidelberg |
| Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA | Novagen, Wisconsin, USA |
| Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen | Nunc, Naperville, USA |
| Biozym, Hess, Oldendorf | PAN Biotech, Aidenbach |
| BMT, Meerbusch-Osterath | Panomics |
| Brand, Wertheim | PerkinElmer, Massachusetts, USA |
| Branson Ultrasonics, Danbury, USA | Pharmacia, Uppsala, Schweden |
| Braun, Melsungen | Promega, Madison, USA |
| Buddeberg | PromoCell, Heidelberg |
| Corning, New York, USA | Qiagen, Chatsworth, Kalifornien, USA |
| DAKO, Glostrup, Dänemark | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| Dianova, Hamburg | Roche, Mannheim |
| Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA | Sartorius, Göttingen |
| Dynal, Oslo, Norwegen | Sequiaserve, Vaterstetten |
| Eppendorf, Hamburg | Serotec, Oxford, UK |
| Falcon, Oxnard, Kalifornien, USA | Sigma, St. Louis, Missouri, USA |
| Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich | Starlab, Ahrensburg |
| Greiner, Nürtingen | Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA |
| Heraeus, Hanau | VWR International GMBH, Darmstadt |
| IKA Labortechnik, Staufen | |

8 Kooperationspartner

Dr. Matthias Witt und Dr. Rudolf Gruber, Rheumatologie, Klinikum LMU München

Prof. Dr. Jörg Prinz, Dermatologie, LMU München

Dr. Babak Moradi, Orthopädische Universitätsklinik Heidelberg

Prof. Dr. Hanns-Martin Lorenz, Universitätsklinik Heidelberg, Sektion Rheumatologie

PD. Dr. med. Norbert Blank, Universitätsklinik Heidelberg, Sektion Rheumatologie

Die Materialentnahme ist in den Anträgen der jeweiligen klinischen Partner bei den lokalen Ethikkommissionen abgebildet.

D. Methoden

1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Alle Schritte der Zellkultivierung wurden mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien an einer Sterilwerkbank durchgeführt um eine Kontamination mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden. Die Zellkulturen wurden bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert.

1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen längerfristig in flüssigem Stickstoff lagern zu können, wurde ihnen das Gefrierschutzmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) zugesetzt. Dies dringt in die Zellen ein und führt dabei zu einer Verminderung des Wassergehaltes, wodurch die Bildung von Eiskristallen und damit eine Schädigung der Zellen verhindert werden. Da DMSO auf stoffwechselintakte Zellen toxisch wirkt, wurden alle Arbeitsschritte mit vorgekühlten Medien und Einfrierröhrchen zügig und auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst durch Zentrifugation (8' bei 453g) sedimentiert und das Pellet mit 0,5 ml kaltem FBS resuspendiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens an 20% DMSO in RPMI III wurde die Zellsuspension in die vorgekühlten Einfrierröhrchen gegeben. Diese wurden anschließend in mehrere Lagen Papiertücher gewickelt, um ein langsames und schonendes Einfrieren zu gewährleisten. Die Zellpäckchen wurden zunächst bei -80°C gelagert und für eine längerfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch schnelles Erwärmen der Kryoröhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad. War die Zellsuspension nahezu vollständig aufgetaut, wurden sie mit einer 1:1 Mischung aus FBS und RPMI III aufgenommen und sofort abzentrifugiert (8' bei 453g). Um das zelltoxische DMSO vollständig zu entfernen wurden die Zellen nochmals mit 5 ml RPMI III gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Medium in Zellkulturflaschen überführt.

1.2 Bestimmung der Zellzahl

Aus einer Zellsuspension wurden 50 µl steril entnommen und mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt. Aus dieser Mischung wurden 10 µl in eine Neubauerzählkammer pipettiert und am Lichtmikroskop ausgezählt. Da Trypanblau nur beschädigte Plasmamembranen durchdringt, färbt es ausschließlich tote Zellen blau an. Gezählt wurden die lebenden Zellen in einem Großquadrat (16 Kleinquadrate). Damit errechnet sich die Zellzahl pro ml Suspension aus der Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{mittlere Zahl pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

1.3 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC)

1.3.1 Ficoll-Separation

Die Blutentnahme von gesunden Spendern erfolgte ohne Gerinnungshemmer. Um eine vorzeitige Gerinnung zu vermeiden, wurden alle folgenden Schritte zügig durchgeführt. Nach der Abnahme wurde das Blut in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 6-8 sterilen Glaskügelchen (Ø 2-3 mm) überführt und 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) über Kopf bei 33 rpm gerollt. Durch das Hin- und Hergleiten der Glaskügelchen im Blut kommt es zu einer Ansammlung der Gerinnungsfaktoren an den Kügelchen und damit zur Bildung eines festen Blutkuchens (rote Blutkörperchen, Blutplättchen und Fibrin). Dieser wurde entfernt und das Blut für 25 Minuten bei 1065g zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum für eine weitere Verwendung in der Zellkultur abgenommen. Die verbleibende zelluläre Fraktion wurde nun im Verhältnis 1:2 mit RPMI verdünnt, langsam auf 15 ml Ficoll in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet und für 20 Minuten bei 805g ohne zugeschaltete Bremse zentrifugiert. Die Dichte des Ficoll (1,077 g/ml) erlaubt eine Separation der Blutbestandteile gemäß ihrer spezifischen Dichte. Ficoll besitzt eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten und eine geringere Dichte als Erythrozyten und die meisten Granulozyten. Daher setzt sich nach der Zentrifugation die oberste Schicht aus Blutplasma und Thrombozyten zusammen, wohingegen sich zwischen der obersten Schicht und dem Ficoll eine weiße Grenzschicht aus Lymphozyten und Monozyten (milchiger Ring, Interphase) befindet. Unter dem Ficoll befinden sich die Erythrozyten und die restlichen Granulozyten. Die Interphase wurde abgenommen und mit dem fünffachen Volumen an PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in RPMI III aufgenommen und gezählt.

1.3.2 Hypotone Lyse der Erythrozyten

Durch eine hypotone Lyse wurden alle Leukozyten aus dem venösen, mit Heparin oder EDTA versetzten Blut der Patienten isoliert. Das Verfahren nutzt die osmotischen Eigenschaften des Ammoniumchlorids und führt durch das Einströmen von Wasser zum Platzen der dünnwandigen Erythrozyten. Hierfür wird die Blutprobe mit 5 Teilen Erylyse-Puffer (1x) versetzt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit 20 ml PBS gewaschen und für 8 Minuten bei 453g zentrifugiert. Der Überstand (Lysat der Erythrozyten) wurde abgesaugt und der Lyse-Schritt gegebenenfalls ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in RPMI Medium aufgenommen und gezählt.

1.4 Isolierung der mononukleären Zellen aus Synovialflüssigkeit (SFMC)

Da die Synovialflüssigkeit im Normalfall weder Erythrozyten noch Thrombozyten enthält, wurde keine Lyse oder Ficoll durchgeführt. Kam es bei der Entnahme der Synovialflüssigkeit

jedoch zu einer Einblutung, wurde eine Lyse durchgeführt. Um die mononukleären Zellen und die Granulozyten aus der Synovialflüssigkeit der Patienten zu isolieren, wurden die Proben abzentrifugiert und die sedimentierten Zellen anschließend in 10 ml PBS aufgenommen. War die Synovialflüssigkeit sehr dickflüssig, wurde diese zuvor mit PBS 1:2 verdünnt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde nochmals mit PBS gewaschen. Kam es zur Bildung von Zellklumpen, wurden die Zellen durch eine sterile Gaze filtriert und anschließend gezählt.

1.5 Isolierung der mononukleären Zellen aus Synovialgewebe

Die Synovialmembran wurde zunächst mit einem Skalpell in sehr kleine Stücke geschnitten. Diese wurden in ein Verdaumedium (0,1 mg/ml Hyaluronidase, 0,2 mg/ml Kollagenase, 10% FBS in 20 ml RPMI III) gegeben und für drei Stunden bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Verdauungsansatz durch ein Zellsieb (40 µm) gedrückt und die gewonnene Zellsuspension 8 Minuten bei 453g zentrifugiert, nochmals mit PBS gewaschen und gezählt. Für die folgende FACS-Analyse wurden 200.000 - 300.000 Zellen eingesetzt.

1.6 Separierung von NK- und T-Zellen aus PBMC

Die Isolierung von NK- oder T-Zellen aus PBMC gesunder Spender erfolgte durch die negative Isolation mit Dynabeads® (Invitrogen) oder mit der MACS-Technologie (Miltenyi). Die Technologie basiert bei beiden Anbietern auf einer Anreicherung der gewünschten Zellpopulation durch eine antikörpervermittelte Depletion der unerwünschten Zellen.

1.6.1 Separation mit Dynabeads®

Bei der Dynabead-Methode werden PBMC zuerst mit einem Antikörpermischung aus biotinylierten Antikörpern gegen CD3, CD14, CD36, CDw123, HLA Klasse II DR/DP und CD235a (Glycophorin A) inkubiert. Dabei binden die Antikörper an die jeweiligen Epitope auf den zu depletierenden mononukleären Zellen. Nach einem Waschschrift wird die Zellsuspension mit Streptavidin gekoppelten Eisenpartikeln (Dynabeads®) inkubiert, die wiederum an die biotinylierten Antikörper binden. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Zellsuspension für 2 Minuten in einen reaktionsgefäßumhüllenden Magneten gestellt. Dadurch werden die eisenpartikelmarkierten Zellen direkt an die Wand des Reaktionsgefäßes gezogen und festgehalten. Zellen die nicht an Dynabeads® gekoppelt sind (isolierte NK- oder T-Zellen), befinden sich im Überstand und können in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels einer FACS-Analyse bestimmt.

1.6.2 Separation mit der MACS Technologie

Die MACS (magnetic activated cell sorting) -Technologie beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Separation über Dynabeads®. Bei der Dynabead®-Technologie werden relativ große, Streptavidin-markierte Eisenpartikel (\varnothing 2.8-4.5 μm), welche an biotinilierten Antikörper binden, verwendet. Die MACS-Technologie verwendet ebenfalls Streptavidin-markierte Eisenpartikel, die jedoch mit 50 nm deutlich kleiner sind als Dynabeads®. Die magnetische Trennung erfolgt bei der MACS-Methode daher nicht, wie bei der Dynabead-Methode, direkt sondern über eine Säule mit Eisenkern, der mit einem Magneten vollständig magnetisiert werden kann.

1.7 Kultivierung von adhärenenten und Suspensions-Zellen

Die Kultivierung von adhärenent wachsenden Zellen erfolgte in dem für die Zellen optimalen Medium in liegenden Kulturflaschen. In kleinen Kulturflaschen (KKF, 25 cm^2) wurden 8 - 9 ml Medium verwendet und in mittleren Kulturflaschen (MKF, 75 cm^2) 10 - 12 ml. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Waren die Zellen dicht gewachsen (Konfluenz >80%), wurden sie auf zwei Kulturflaschen aufgeteilt, wozu die Zellen in Suspension gebracht werden mussten. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, um das im Medium enthaltene FBS vollständig zu entfernen. Anschließend wurde Trypsin/EDTA zugegeben (10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) und die Flaschen bei 37°C im Brutschrank für ca. 5 Minuten inkubiert. Trypsin/EDTA führt durch proteolytische Spaltung von Bindeproteinen und Komplexierung von zweiwertigen Kationen zu einer Ablösung der Zellen, was unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FBS-haltigem Medium gestoppt, da FBS die Aktivität von Trypsin hemmt. Danach konnte die Zellsuspension auf zwei Flaschen verteilt oder für Experimente verwendet werden. Suspensionszellen wurden in entsprechendem Medium in kleinen oder mittleren Kulturflaschen kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde die Hälfte des Mediums abgesaugt und durch frisches ersetzt.

1.8 Kultivierung von PBMC bzw. NK-Zellen

Zur Kurzzeitkultivierung von isolierten PBMC (siehe Methoden D.1.3, Seite 41) bzw. separierten NK- oder T-Zellen (siehe Methoden D.1.6, Seite 42) wurden diese mit RPMI III, 10% HS und 500 U/ml IL-2 in eine 24-Lochplatte ausgesät (1×10^6 Zellen/ 1,5 ml). Alle drei bis vier Tage wurde das Medium zur Hälfte abgesaugt und durch frisches ersetzt.

1.9 Rezeptorstimulation mit Plattengebundenen Antikörpern

Um einen Effekt der Stimulation bestimmter Rezeptoren auf die Degranulation (siehe Methoden D.3.1, Seite 47) und die Zytokinsekretion (siehe Methoden D.5, Seite 50) von NK-

Zellen zu untersuchen, wurden rezeptorspezifische, plattengebundene Antikörper benutzt. Das Koppeln der Antikörper ist notwendig, da für eine erfolgreiche Stimulation von Rezeptoren eine Quervernetzung stattfinden muss, die durch lösliche Antikörper nicht erreicht werden kann. Für die Kopplung wurde als Primärantikörper ein α Maus-IgG F(ab)₂-Fragment (20 μ g/ml in PBS) über Nacht bei 4°C an eine 24- oder 96-Lochbodenplatte gebunden. Nach zweimaligem Waschen mit 200 oder 100 μ l PBS wurden ein oder zwei (bei Kostimulationsexperimenten) der entsprechenden Maus-IgG-Sekundärantikörper (10 μ g/ml) zugegeben und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren zweimaligem Waschschrift mit PBS konnten die jeweiligen Zellen in einem Volumen von 1000 oder 200 μ l zugegeben und je nach Fragestellung unterschiedlich lange inkubiert werden.

2 Durchflusszytometrie

2.1 Allgemein

Die Durchflusszytometrie am *fluorescence activated cell sorting* (FACS) ist eine lasergestützte Methode zur Bestimmung der Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften von Partikeln, im Speziellen von Zellen. Bei der Messung werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Messküvette aufgesogen und dabei vereinzelt (hydrodynamische Fokussierung). Die Zellen passieren nun verschiedene Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen, welche die jeweiligen antikörpergekoppelten Fluorophore anregen. Dabei absorbieren sie die Energie des Laserlichts und geben sie in Form einer für das jeweilige Fluorophor bestimmten Wellenlänge wieder ab (Emission), welche von einem Photodetektor erfasst wird. Zusätzlich zu der Fluoreszenz wird das Streulicht (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht) von einem Detektor aufgenommen. Das Vorwärtsstreulicht erlaubt eine Aussage über die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Zellgranularität. Die FACS-Analysen in der vorliegenden Arbeit wurden am LSR II von BD Biosciences durchgeführt. Das Gerät ist ausgestattet mit einem UV-Laser (355 nm), einem violetten Laser (405 nm), einem blauen Laser (Argon-Laser, 488 nm) und einem roten Laser (Helium-Neon-Laser, 633 nm). Zudem verfügt der LSR II über ein digitales Aufnahmesystem, in dem die Skalierung der digitalen Messwerte auch negative Werte annehmen kann und als biexponentielle Darstellung wiedergegeben wird. Die monoklonalen Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren mit folgenden Fluorophoren konjugiert:

| | | Emissionsmaximum |
|-------|-------------------------------|------------------|
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat | 530 nm |
| PE | Phycoerythrin | 585 nm |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein | 678 nm |

| | | |
|--------------------|-----------------|--------|
| APC | Allophycocyanin | 767 nm |
| PE-Texas Red (ECD) | | 615 nm |
| Pacific Blue | | 455 nm |
| Alexa Fluor 700 | | 723 nm |

2.2 Direkte Färbung

Die zu messenden Zellen wurden abzentrifugiert und in FACS-Puffer aufgenommen. Pro Ansatz wurden 50 µl Zellsuspension (50.000 – 300.000 Zellen) mit jeweils 2-3 µl von bis zu sieben verschiedenen direkt markierten Antikörpern für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 500 µl FACS-Puffer zu den Zellen gegeben und für 5 Minuten bei 1065g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die markierten Zellen entweder in 100 - 150 µl FACS-Puffer aufgenommen und sofort gemessen oder mit 100 - 150 µl 1%iger PFA-Lösung (in PBS) fixiert und innerhalb der nächsten Tage gemessen. Zu jeder Messung wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Als Negativkontrolle dienten nicht spezifisch bindende Antikörper mit den jeweils in der Messung verwendeten Isotypen (Isotypkontrollen). Die fixierten FACS-Proben wurden bis zur Messung im Dunklen bei 4°C aufbewahrt, um ein Ausbleichen der Farbstoffe zu vermeiden.

2.3 Chemokinrezeptor-Färbung

Die Färbung von Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von Zellen erfolgte wie die unter D.2.2 (Seite 45) beschriebene direkte Färbung. Die Inkubation mit den konjugierten Antikörpern erfolgte hier jedoch für 30 Minuten bei 37°C. Um eine mögliche Internalisierung der Chemokinrezeptoren zu stoppen, wurden die Zellen anschließend sofort auf Eis gestellt, mit FACS-Puffer gewaschen und das Pellet in 100 - 150 µl 1%iger PFA-Lösung (in PBS) aufgenommen.

2.4 Indirekte Färbung

Unmarkierte Antikörper mussten mittels einer indirekten Färbung nachgewiesen werden. Hierfür wurden 50.000 bis 300.000 Zellen in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit 40 - 50 µl des (ersten) unmarkierten Antikörpers (Primärantikörper) für 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Entfernung der ungebundenen Antikörper durch einmaliges Waschen mit 120 µl FACS-Puffer wurden 50 µl des spezifischen Sekundärantikörpers (PE- oder FITC-markiert) zugegeben und die Zellen weitere 20 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Die spezies- und isotypspezifischen Sekundärantikörper binden währenddessen an den konstanten Fc-Teil des Primärantikörpers. Anschließend wurden die Zellen, wie für die direkte Färbung beschrieben

(siehe Methoden 2.2, Seite 45), weiterbehandelt. Als Isotypkontrollen dienten nicht-bindende, unmarkierte Primärantikörper.

2.5 Zellstimulation mit PMA/Ionomycin und intrazelluläre Färbung

Für die durchflusszytometrische Bestimmung intrazellulärer Zytokine wurden PBMC oder separierte NK-Zellen mit 10 ng/ml Phorbol myristate acetat (PMA) und 500 ng/ml Ionomycin in Tumormedium inkubiert. Als Negativkontrolle (unstimulierte Zellen) wurden die Zellen in Tumormedium ohne PMA und Ionomycin mitgeführt. Nach einer Stunde bei 37°C wurden zu beiden Ansätzen je 2 µl Monensin (20 µM) gegeben und 3 weitere Stunden bei 37°C inkubiert. Monensin wurde hinzugefügt, um den Export der im Golgi-Apparat neusynthetisierten Zytokine aus der Zelle zu unterbinden und damit die Menge von intrazellulärem Zytokin pro Zelle zu steigern. PMA besitzt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit Diacylglycerol (DAG), dem natürlichen Aktivator des Signaltransduktionsmoleküls Proteinkinase C (PKC). Zusammen mit Ionomycin, einem Ca^{2+} -Ionophor, das zu einem anhaltenden extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom führt, vermitteln die beiden pharmakologischen Substanzen eine starke Aktivierung der behandelten Zellen und damit eine erhöhte Zytokinfreisetzung.

Für die intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung wurden die stimulierten und unstimulierten Zellen zunächst einer Oberflächenfärbung (siehe Methoden 2.2, Seite 45) unterzogen und anschließend mit einer 1,5%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Damit fluoreszenz-markierte Antikörper in das Innere der Zellen gelangen können, wurden diese nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer mit einer 0,05%igen Saponin-Lösung für 5 Minuten bei RT inkubiert. Saponin permeabilisiert die Zellmembran durch Interaktion mit dem Cholesterin der Zellmembran. Dadurch entstehen Poren, die so groß sind, dass die konjugierten Antikörper in die Zelle gelangen können. Da die Permeabilisierung reversibel ist wurde Saponin bei allen folgenden Färbe- und Waschschriften zugesetzt. Die Zellen wurden bei 1065g für 5 Minuten abzentrifugiert und das Pellet mit 50 µl der intrazellulären Antikörper in FACS-Puffer mit 0,1% Saponin resuspendiert. Nach 20 Minuten im Dunkeln bei RT wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und das Pellet mit einer 1%igen PFA-Lösung aufgenommen.

2.6 Messung und Auswertung

Da die einzelnen Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe überlappen können, ist es nötig, eine Korrektur der Überlappung (Kompensation) durchzuführen. Werden beispielsweise FITC-Signale im PE-Kanal gemessen, müssen die entsprechenden Prozente des FITC-Signals vom PE-Signal abgezogen werden ($\text{PE-Signal} = \text{PE-Signal} - X\% \text{ des überlappenden FITC-Signals}$). Dazu wurden Einzelfärbungen mit nur einem spezifisch fluoreszenzmarkierten Antikörper angefertigt. Waren ausreichend Zellen vorhanden, wurde die Einzelfärbung mit ihnen durchgeführt. Bei Analysen mit wenigen Zellen wurden „BD™CompBeads“ für die

Kompensation verwendet. CompBeads sind kleine Polystyrene Kügelchen, die an die leichte Kappa-Kette von Antikörpern binden und wie Zellen im FACS gemessen werden können. Die Kompensation am LSRII erfolgte automatisch. Zur Messung am LSRII wurde die FACSDiva Software 6.1.2 (BD Bioscience) verwendet und zur Auswertung die FACSDiva Software 6.1.1.

3 Messung der Zytotoxizität von T- und NK-Zellen

3.1 CD107a-Degranulations-Versuch

Das Degranulationsverhalten von NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) nach einem bestimmten Stimulus wurde über den Nachweis der CD107a Oberflächenmobilisierung untersucht [88]. CD107a (LAMP-1) ist ein Membranprotein an der Oberfläche intrazellulärer zytotoxischer Granula von NK-Zellen und ZTL. Erhalten NK-Zellen bzw. ZTL einen positiven Stimulus (von Zielzellen oder plattengebundenen Antikörpern, siehe 1.9, Seite 43) kommt es zu einer Ausschüttung der zytotoxischen Granula. Dabei gelangen die CD107a Moleküle durch Verschmelzung der Membranen an die Oberfläche. Durch die Zugabe fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen CD107a während der Koinkubation von Effektor- und Zielzelle werden alle während des Stimulationszeitraums auf die Oberfläche gelangten Moleküle markiert. Die resultierende Fluoreszenzintensität der degranulierenden Zellen ist somit proportional zum Ausmaß der Degranulation. Der Degranulationsversuch wurde entweder mit Zielzellen (K562, Daudi und 721.221) oder mit plattengebundenen Antikörpern durchgeführt.

3.1.1 Degranulationsversuch mit Zielzellen

PBMC (Effektorzellen, E) wurden mit 500 U/ml IL-2 für 48 h vorstimuliert und anschließend mit den Zielzellen (Z) im Verhältnis 3:1 (E:Z) koinkubiert. Dazu wurden die Zellen in eine 96-Loch-U-Boden Platte mit 190 µl Tumormedium und 10 µl PE-markiertem CD107a Antikörper gegeben. Um die spontane Degranulation quantifizieren zu können, wurde ein Kontrollansatz ohne Zugabe von Zielzellen mitgeführt. Um eine Internalisierung von CD107a während der Inkubation zu verhindern, wurde nach einer Stunde bei 37°C zu jedem Ansatz 5 µl Monensin (2 mM) gegeben und für weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Monensin ist ein Na⁺-Ionophor, dass den trans-Golgi-Proteintransport blockiert, indem es den dafür wichtigen intrazellulären Na⁺ und H⁺ Gradienten inhibiert [89]. Nach 4 Stunden Inkubation erfolgte eine Antikörperfärbung um die Degranulation einzelner Subpopulationen analysieren zu können. In der anschließenden durchflusszytometrischen Messung wurden die Effektorzellen anhand ihrer Größe von den Zielzellen unterschieden. Des Weiteren wurden NK-Zellen durch ihren CD3⁻ und CD56⁺ Phänotyp und T-Zellen durch ihren CD3⁺ und CD56⁻ Phänotyp von den übrigen PBMC unterschieden und die CD107a Expression dargestellt.

3.1.2 Degranulationsversuch mit plattengebundenen Antikörpern

NK-Zellen und ZTL können sowohl mit speziellen Zielzellen als auch mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenrezeptoren stimuliert werden. Da für eine erfolgreiche Stimulation von Rezeptoren eine Quervernetzung stattfinden muss, wurden die Antikörper auf einer Platte immobilisiert (siehe Methoden 1.9, Seite 43). Die PBMC werden hier ebenfalls 48 h mit 500 U/ml IL-2 vorstimuliert und mit 190 µl Tumormedium und 10 µl PE-markiertem CD107a Antikörper in die Platte mit den gebundenen Antikörpern gegeben. Nach einer Stunde wurden zu jedem Ansatz 5 µl Monensin (2 mM) gegeben und für weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert (siehe Methoden 3.1.1, Seite 47). Im Anschluss daran wurde die CD107a Expression der untersuchten Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

4 Molekularbiologische Methoden

4.1 RNS-Isolierung

Für die Isolierung von mRNS aus 0,5 bis 5×10^6 Zellen wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Gehalt an mRNS wurde mit einer 1:100 Verdünnung bei einer OD (optische Dichte) von 260 nm am Spektrometer gemessen. Hierfür sollte die OD 260/280-Ratio bei einer Verdünnung in RNase-freiem Wasser zwischen 1,6 und 1,9 liegen. Die RNS wurde bei -80 °C aufbewahrt.

4.2 Reverse Transkription

Die isolierte mRNS wurde durch reverse Transkription in cDNS umgeschrieben. Dafür wurden 1-5 µg der mRNS mit 0,5 µg/µl Oligo-dT Primern add 12 µl DEPC Wasser für 10 Minuten bei 70°C im Thermoblock inkubiert und sofort auf Eis überführt. Während diesem Schritt binden die Oligo-dT Primer an die polyA-Reste der mRNS. Nach Zugabe von 8 µl eines Reaktionsgemisches aus 1x *first strand buffer*, 10 mM Dithiothreitol (DTT), 0,5 mM dNTP und 200 U der reversen Transkriptase Superscript II wurde der 20 µl-Gesamtansatz in einem PCR-Gerät für 70 Minuten bei 42 °C inkubiert. Hierbei wurde die mRNS in cDNS umgeschrieben. In einem weiteren Inkubationsschritt von 5 Minuten bei 90°C wurde die Transkriptase inaktiviert. Die cDNS wurde bei -20°C gelagert.

4.3 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können spezifische Sequenzen genomischer DNS oder cDNS amplifiziert werden. Um zu überprüfen, ob diese Sequenzen in der DNS enthalten sind, wurde die Reaktion mit spezifischen Primern für die entsprechenden Gene durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde immer β -Aktin amplifiziert. Hierbei handelt es sich um

ein sogenanntes „Haushaltsgen“, dass konstitutiv von jeder Zelle exprimiert wird. Als Negativkontrolle wurde in einem Ansatz die DNS durch Wasser ersetzt. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und die Endkonzentrationen der verschiedenen Reagenzien für die CD6ΔD3-PCR sowie für die β-Aktin-PCR:

| Eingesetzte Menge | Endkonzentration | Komponente | Stammlösung |
|-------------------|------------------|------------------|-------------|
| variabel | 5-15 ng | DNS | variabel |
| 2 µl | 1x | PCR Puffer | 10x |
| 0.6 µl | 1.5 mM | Magnesiumchlorid | 50 mM |
| 2 µl | 1 mM | dNTPs | 10 mM |
| variabel | 15 pMol | Primer sense | variabel |
| variabel | 15 pMol | Primer antisense | variabel |
| 0.2 µl | 1U | Taq Polymerase | 5 U/µl |
| ad 20 µl | | Wasser | |

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

| Schritt | Dauer | Temperatur | Zyklen |
|-----------|-------|------------|--------|
| Schritt 1 | 3' | 96 °C | 1 |
| Schritt 2 | 20'' | 96°C | 5 |
| | 20'' | 60°C | |
| | 20'' | 72°C | |
| Schritt 3 | 10'' | 96°C | 30 |
| | 15'' | 60°C | |
| | 20'' | 72°C | |
| | 1' | 72 °C | |
| Schritt 4 | 10' | 72 °C | 1 |
| Schritt 5 | ∞ | 4 °C | 1 |

4.4 Gelelektrophorese

Die amplifizierte DNS wurde in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Für die Herstellung eines Gels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nachdem die gelöste Agarose etwas abgekühlt war, wurden 3 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und emittiert unter UV-Bestrahlung sichtbares Licht. Nach der Polymerisation des Gels wurde es in eine mit Laufpuffer (1x TAE Puffer) gefüllte Kammer gegeben und die Proben aufgetragen. Hierfür wurde zu 20 µl Probe 4 µl Auftragspuffer (6x) gegeben und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 90 Volt. Dabei wurde die negativ geladene DNS in Richtung des positiven Pols gezogen. Nach Auftrennung der Proben wurde das Gel unter

UV-Licht mit einer Digitalkamera fotografiert und die Banden für eine anschließende Sequenzierung gegebenenfalls ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe Methoden 4.5).

4.5 Isolierung von DNS aus Agarosegel

Zur Isolierung bestimmter DNS-Fragmente aus dem Agarosegel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet. Die Fragmente wurden auf einem UV-Schirm aus dem Gel ausgeschnitten und über eine Qiagen-Säule aufgereinigt. Hierbei bindet die DNS an eine Siliziumgel-Membran in der Säule. Die in dem Kit befindlichen Puffer besitzen bestimmte Salzkonzentrationen und pH-Werte, die zunächst das Binden und später das Eluieren der DNS ermöglichen. Die Bindung erfolgte bei einer hohen Konzentration an chaotrophischen Salzen, welche die Wasserstruktur modifizieren. Der Puffer QG löst die Agarose und schafft die Bedingungen für die Bindung der DNS an die Membran. Puffer PE wäscht die Salze, Primer, Ethidiumbromid, Enzyme und Detergenzien heraus und mit dem Puffer EB oder Wasser kann die DNS anschließend eluiert werden. Das Kit eignet sich für Konstrukte mit einer Größe von 70 bp bis 10 kb. Die Aufarbeitung wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

5 Multiplex-Analysen

5.1 Allgemein

Die Multiplex-Technologie ermöglicht eine simultane Analyse von zahlreichen Parametern aus einem sehr kleinen Probenvolumen. Die Methode beruht auf der Verwendung von Polystyrol-Mikropartikeln (\varnothing 5,6 μm) die sowohl mit Antikörpern („Fänger-Antikörper“) gegen die zu messenden Analyte gekoppelt sind, als auch eine eigene, jeweils unterschiedliche rote Fluoreszenz aufweisen (Abbildung 10/A). Binden Analyte an die spezifischen „Fänger-Antikörper“ eines Mikropartikels, können sie mit einem analytspezifischen, biotinylierten Zweitantikörper erfasst und anschließend durch an Streptavidin gekoppeltes PE sichtbar gemacht werden (Abbildung 10/B). Die Messung erfolgte an dem Bio-Plex 200 System von BioRad. Sie basiert auf einer durchflusszytometrischen Methode, bei der die Mikropartikel durch eine Messküvette an zwei Laserstrahlen vorbeigeleitet werden. Der rote Detektionslaser erkennt die individuelle Färbung der Mikropartikel und kann sie so einer bestimmten Gruppe (Region) zuordnen. Ein grüner Laser erkennt simultan die orangefarbene Fluoreszenz des PE-gekoppelten Streptavidins und kann so zu jedem Mikropartikel gleichzeitig eine Quantifizierung der gebundenen Analyten angeben (Abbildung 10/C und D).

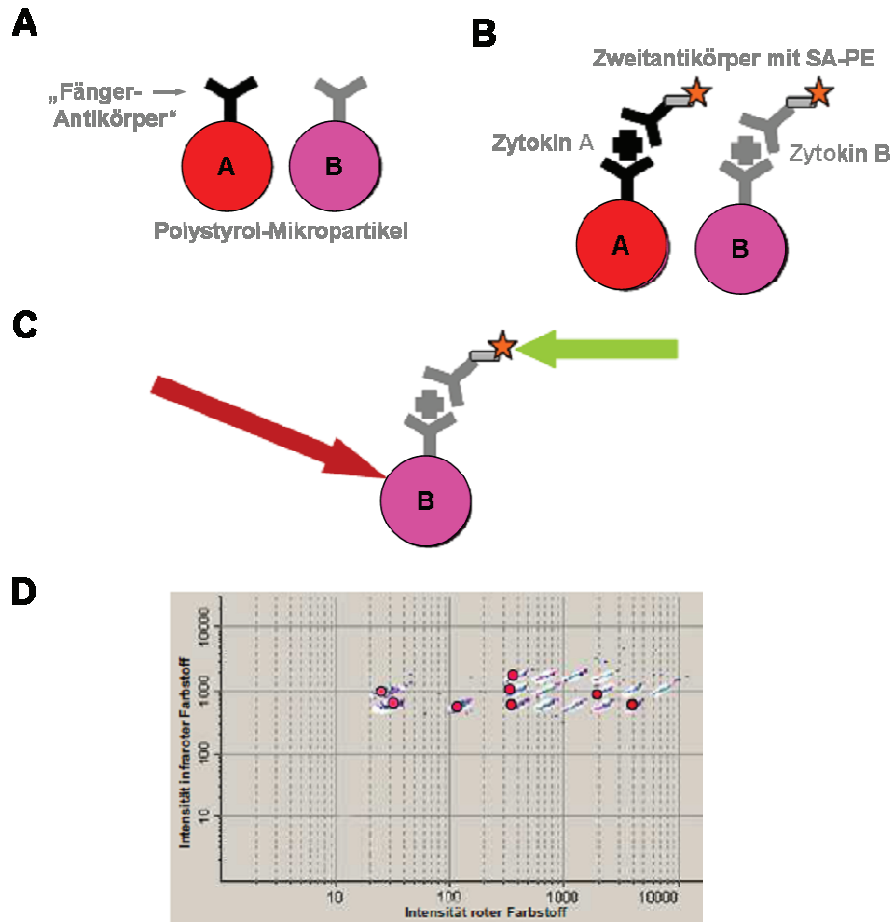


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Multiplex-Technologie zur Zytokinbestimmung.

Die Mikropartikel sind mit roten und infraroten Fluoreszenzfarbstoffen in unterschiedlichen Intensitäten der zwei Farbstoffe gefärbt und können so voneinander unterschieden werden. Auf den Mikropartikeln sind spezifische Antikörper gebunden (A). Ein daran gebundener Analyt wird durch einen biotinylierten Sekundärantikörper und PE-gekoppeltem Streptavidin markiert (B). Im Bio-Plex 200-Gerät erkennt der rote Detektionslaser die individuelle Färbung der Mikropartikel (C) und kann sie so einer bestimmten Gruppe (Region) zuordnen (D). Der grüne Laser erkennt simultan die orangefarbene Fluoreszenz des PE-gekoppelten Streptavidins und kann dem Mikropartikel gleichzeitig eine Bindung des Parameters und deren Intensität (=Quantität) zuordnen.

5.2 Zytokinbestimmung

Für die Zytokin- und Chemokinmessungen wurden die Multiplex-Kits der Firma BioRad verwendet. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll. Um die Sensitivität der Messung zu erhöhen, wurden die Proben vor der Messung mindestens 1:1 mit einem „human Serum Diluent“ (BioRad) verdünnt. Zuerst wurden die Mikropartikel und die Proben in einer 96-Loch-Bio-Plex MCV-Platte zusammen inkubiert. Durch dreimaliges Waschen wurden ungebundene Zytokine/Chemokine und andere Bestandteile des Serums/Plasmas entfernt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit den biotinylierten Zweitantikörpern, welche nach weiteren Waschschritten mit PE-gekoppeltem Streptavidin markiert wurden. Zusätzlich zu den Proben wurden immer Standardkonzentrationen jedes Zytokins/Chemokins eingesetzt, welche in einer Verdünnungsreihe (1:4) hergestellt wurden und so die Quantifizierung jedes Analyten über individuelle Standardkurven ermöglichten.

5.3 Messung und Auswertung

Die Standardkurven der verschiedenen Zytokine/Chemokine wurden automatisch von der Bio-Plex Manager Software 6.0 berechnet. Anhand dieser Standardkurven wurden die jeweilige Zytokin- oder Chemokinkonzentrationen in der Probe ermittelt (pg/ml). Das Programm erlaubt es bis zu zwei Einzelwerte, die stark aus dem Standardkurvenbereich fallen, aus der Berechnung herauszunehmen. Hierbei handelte es sich meist um sehr hohe oder sehr niedrige Konzentrationen, so dass nur die Probenwerte, die im linearen Bereich zwischen diesen Randwerten und somit im Standardkurvenbereich lagen, ausgewertet wurden.

6 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Bei einem ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) wird ein Antigen entweder direkt an eine Mikrotiterplatte gebunden und mittels eines Antiköpers nachgewiesen oder man verwendet das sogenannte „Sandwich-Prinzip“. In der vorliegenden Arbeit wurde das „Human IL-22 DuoSet“ Kit (R&D Systems) verwendet welches dem „Sandwich-Prinzip“ folgt und nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Dazu wurde über Nacht eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit einem IL-22 spezifischen „Fang-Antikörper“ beschichtet. Nach einem Blockierungsschritt, der unspezifische Bindungen verhindern soll, wurde die IL-22haltige Probenlösung (Plasma oder Synovialflüssigkeit) auf die Platte gegeben. In den folgenden 2 Stunden bei RT konnte IL-22 an den „Fang-Antikörper“ binden. Anschließend wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper zugegeben, der ebenfalls an das bereits gekoppelte IL-22 bindet. Für die Detektion wurde Meerrettichperoxidase (HRP, engl. für horseradish peroxidase) gekoppeltes Streptavidin zugegeben, das an das Biotin des Zweitantikörpers bindet und ein Substrat aus H_2O_2 und Tetramethylbenzidin (TMB). Das H_2O_2 wird von der HRP umgesetzt wodurch Protonen frei werden, die das farblose TMB zu einem blauen Endprodukt oxidieren. Durch Zugabe von Schwefelsäure wird diese Reaktion abgestoppt und ein stabiler gelber Farbkomplex entsteht. Die optische Dichte wurde mit dem Sunrise Microplate Reader (TECAN) bei 450 nm gemessen

7 Analyse der Migration von peripheren mononukleären Zellen

Das Prinzip des Chemotaxis-Versuchs besteht darin, dass die Zahl der migrierenden Zellen von einem Kompartiment in ein anderes entlang eines Konzentrationsgradienten quantifiziert wird. Verwendet werden hierzu Zellkulturplatten, in die siebförmige Einsätze eingesetzt werden. Auf diese Weise entstehen zwei Kompartimente, die durch eine Membran mit einer Porengröße von 5 μm voneinander getrennt sind. Die Zellsiebbarriere erlaubt Zellen ein

aktives Durchwandern in das untere Kompartiment, ein passives Herunterfallen ist dabei nicht möglich.

Für den Versuch wurden 400.000 PBMC in 100 µl Migrationsmedium (RPMI III mit 0,5% BSA) aufgenommen und in ein Zellsieb (Porengröße 5 µm, von Corning Costar) einer 24-Loch-Zellkulturplatte gegeben. Die Chemokine CXCL10 (IP-10), CCL5 (RANTES), CXCL12 (SDF-1α), CXCL1 (GRO-α) oder CXCL8 (IL-8) wurden mit Migrationsmedium auf eine Konzentration von 100 ng/ml eingestellt und 600 µl davon in die untere Kammer gegeben. Um die spontane Zellmigration von der gerichteten chemokin-vermittelten Zellmigration zu unterscheiden, wurde zusätzlich ein Ansatz mit Migrationsmedium ohne Lockstoff mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei 37°C wurden die Zellen aus der unteren Kammer geerntet und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD56, CD3, CD16 und CD6 gefärbt (siehe Methoden D.2.2, Seite 45). Um die Anzahl der migrierten Zellen zu ermitteln wurden kurz vor der durchflusszytometrischen Analyse 30 µl von 1:100 vorverdünnten CompBeads™ (BD) zu den gefärbten Zellen gegeben. Während der Messung wurde auf die CompBeads™ „gated“ und exakt 5000 davon aufgenommen. Mit Hilfe der CompBeads™ konnte so die Anzahl der migrierten Zellen pro 5000 CompBeads™ ermittelt werden. Um die x-fache Migration anzugeben, wurde von allen Proben der Migrationsindex ermittelt. Dieser errechnet sich aus der Anzahl der migrierten Zellen zum Migrationsmedium mit Chemokin, geteilt durch die Anzahl der migrierten Zellen zum Medium ohne Chemokin (spontane Migration).

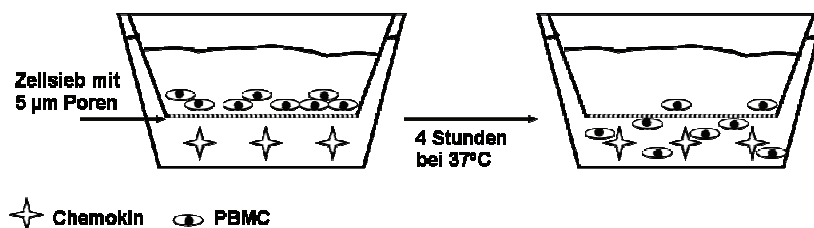


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Migrations-Versuchs.

Dargestellt ist eine Boyden-Kammer mit einem oberen Zellsiebeinsatz (5 µm Porengröße) und einer unteren Kammer. Das Zellsieb diente hier als Barriere um das Migrationsverhalten der Zellen hin zu einem Chemokin zu untersuchen. In das obere Zellsieb wurde Medium mit PBMC und in die untere Kammer Medium mit einem bestimmten Chemokin gegeben. Nach 4 Stunden bei 37°C wurden die migrierten Zellen aus der unteren Kammer geerntet und durchflusszytometrisch analysiert.

8 Statistik

Für die Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde die Software GraphPad Prism 5 verwendet. Für normalverteilte Werte wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test und für nicht normalverteilte Werte der ungepaarte-t-test angewendet.

E. Ergebnisse

1 Phänotyp und funktionelle Relevanz peripherer NK- und T-Zellen im Hinblick auf die CD6 Expression

NK-Zellen exprimieren, im Gegensatz zu T- und B-Zellen, nicht einen spezifischen aktivierenden Rezeptor (TZR, bzw. BZR), sondern eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren. Diese Rezeptoren können dabei sowohl aktivierende- (Zytotoxizität und Zytokinausschüttung) als auch inhibierende (Abschalten der Effektorfunktion) Signale an die NK-Zelle vermitteln. In unserer Arbeitsgruppe konnte ein weiterer Rezeptor auf NK-Zellen identifiziert werden, der als differentieller Marker für die beiden NK-Zell-Subpopulationen CD56^{dim} und CD56^{bright} dient. Dabei handelt es sich um CD6, ein zunächst nur auf T-Zellen beschriebener Rezeptor, der durch Bindung des Zelladhäsionsmoleküls ALCAM (CD166) zur Stabilisierung der immunologischen Synapse mit antigenpräsentierenden Zellen beiträgt [90]. Wobei die kostimulatorischen Signale von CD6 Aktivierungs-, Proliferations- und Differenzierungsvorgänge in den T-Zellen unterstützen [91]. Die Funktion von CD6 auf NK-Zellen ist dagegen noch nicht untersucht worden. Im ersten Teil der Ergebnisse wurde deshalb zunächst die CD6 Expression auf NK- und T-Zellen aus dem Blut (Peripherie) phänotypisch charakterisiert und im Anschluss daran die Funktion von CD6 auf NK-Zellen untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die NK- und T-Zellen im Kontext der autoimmunen und nicht-autoimmunen Krankheitsbilder Arthritis und Arthrose auch im Hinblick auf die CD6 Expression betrachtet.

1.1 CD6 und CD16 Expression auf humanen peripheren NK- und T-Zellen

In der Peripherie gesunder Spender sind 5-20% aller Lymphozyten NK-Zellen, die aufgrund ihrer CD56 Oberflächenexpression in zwei Subgruppen unterteilt werden können. Ungefähr 90% der NK-Zellen in der Peripherie exprimieren CD56 in geringer Dichte auf der Zelloberfläche und werden deshalb als CD56^{dim} bezeichnet. Die restlichen 10% der NK-Zellen exprimieren CD56 deutlich stärker auf ihrer Oberfläche und werden daher als CD56^{bright} NK-Zellen bezeichnet [30]. Eine weitere Unterteilung der beiden NK-Zell-Subgruppen erfolgt über die Darstellung der Expressionsdichte des CD16 Rezeptors. Neben der Einteilung der NK-Zellen nach ihrer CD56/CD16-Expression wurde in unserer Arbeitsgruppe der CD6 Oberflächenrezeptor als weiterer Unterscheidungsmarker für NK-Zellen gefunden, und sollte im Folgenden charakterisiert werden [92].

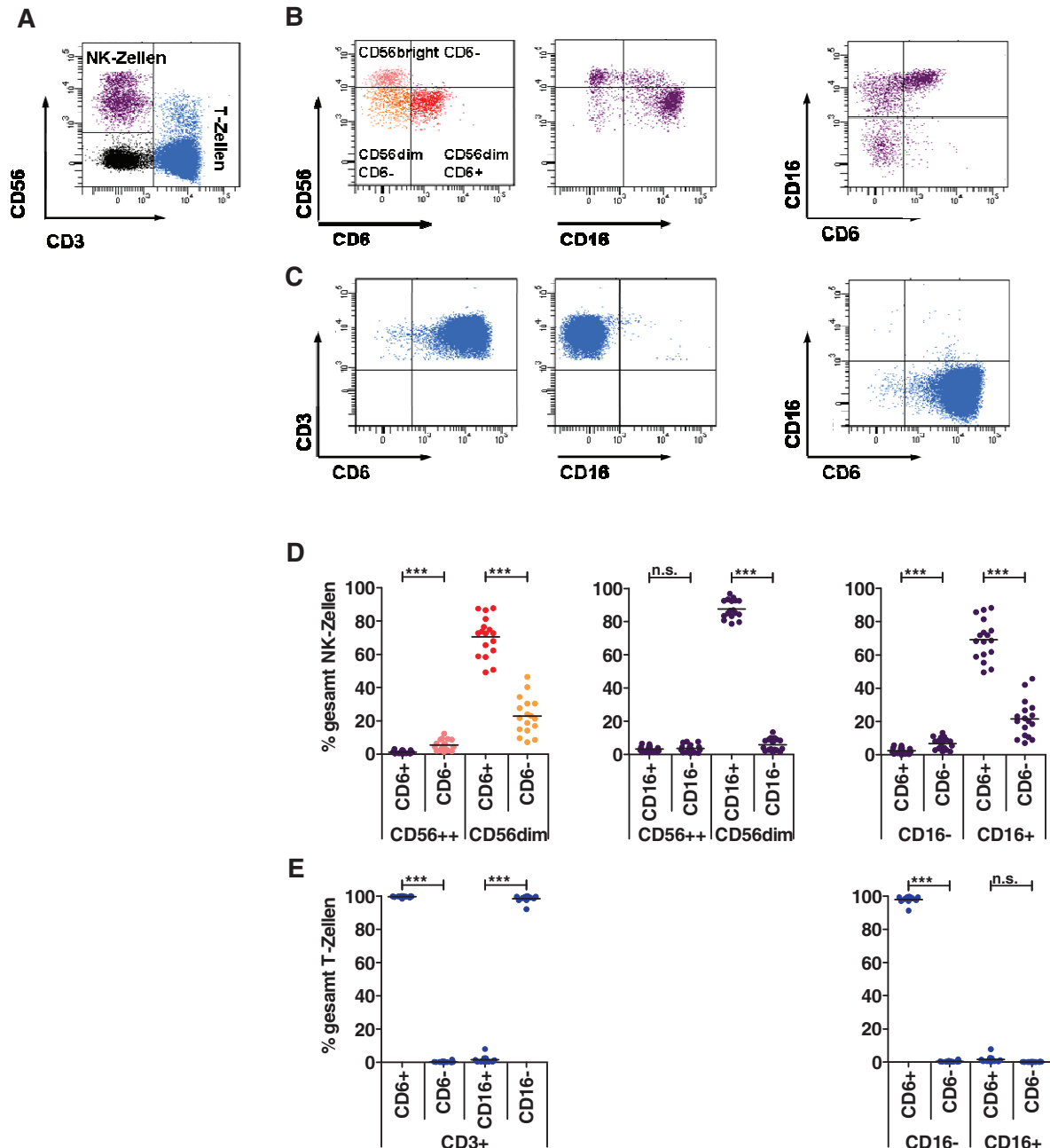


Abbildung 12: CD6 und CD16 Expression auf humanen peripheren NK- und T-Zellen gesunder Spender.

(A) Durchflusszytometrische Darstellung peripherer PBMC eines gesunden Spenders. Die PBMC sind nach ihrer CD3/CD56-Expression aufgetragen. NK-Zellen (CD3⁺/CD56⁺) sind in lila und T-Zellen (CD3⁺/CD56⁻) in blau dargestellt. Für die Betrachtung weiterer Oberflächenrezeptoren auf NK- (B) und T-Zellen (C) wurde zunächst auf CD3/CD56⁺ NK-Zellen und CD3⁺/CD56⁻ T-Zellen gated und anschließend die Oberflächenexpression der Marker CD6 und CD16 in einem neuen Fenster dargestellt. Die NK-Zellen wurden in der CD6 Darstellung weiter unterteilt in CD56^{bright}CD6⁻ (rosa), CD56^{dim}CD6⁻ (gelb) und CD56^{dim}CD6⁺ Zellen (rot). In (D) ist die statistische Verteilung der CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zell-Subpopulationen nach ihrer CD16 und CD6 Expression gezeigt und unter (E) die Verteilung der CD16 und CD6 Expression auf T-Zellen. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der gesamten NK- bzw. T-Zellen. (NK-Zellen n=17, T-Zellen n=12). Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Spender. Der Median ist als schwarzer Balken dargestellt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen sind in Tabelle 5 (Seite 141) zusammengefasst. (***)p<0,0001; n.s.=nicht signifikant)

In Abbildung 12/A-C ist exemplarisch eine durchflusszytometrische Analyse von NK- und T-Zellen aus PBMC eines gesunden Spenders dargestellt. Um die NK- und T-Zellen getrennt voneinander darstellen zu können, wurden die PBMC zunächst nach ihrer Größe und

Granularität ausgewählt und anschließend über die CD56/CD3 Färbung als NK-Zellen ($CD56^+CD3^-$) und T-Zellen ($CD3^+CD56^-$) definiert (Abbildung 12/A). Zur weiteren Charakterisierung ist die Expression der Marker CD6 und CD16 auf NK-Zellen in Abbildung 12/B (lila) und der T-Zellen in Abbildung 12/C (blau) dargestellt. Da CD6 differentiell auf den $CD56^{dim}$ NK-Zellen exprimiert ist wurden hier drei Subpopulationen definiert: $CD56^{bright}CD6^-$ (rosa), $CD56^{dim}CD6^-$ (gelb) und $CD56^{dim}CD6^+$ (rot).

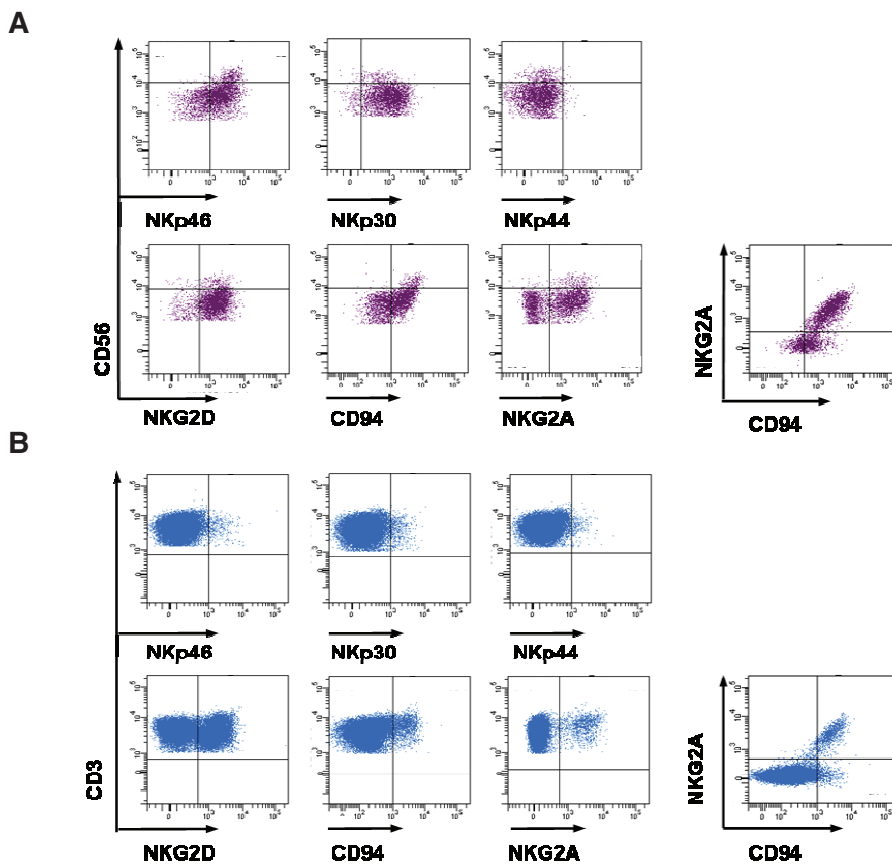
Die Mehrheit der $CD56^{dim}$ NK-Zellen exprimiert CD16 in hoher Dichte. Dagegen exprimieren $CD56^{bright}$ NK-Zellen keine, oder nur eine geringe Menge dieses Fc γ III-Rezeptors (Abbildung 12/D/mitte). Im Gegensatz zu $CD16^+CD56^{dim}$ Zellen exprimieren $CD56^{bright}$ NK-Zellen kein CD6. $CD56^{dim}$ NK-Zellen zeigen hingegen eine heterogene CD6 Expression mit einem signifikant höheren Prozentsatz ($p < 0,0001$) von $CD56^{dim}/CD6^+$ (Mittelwert=70,5%/SD \pm 11,9%) im Vergleich zu $CD56^{dim}/CD6^-$ (22,9 \pm 11,1%) NK-Zellen (Abbildung 12/D/links). Betrachtet man die CD16/CD6 Expression auf NK-Zellen, zeigt sich, dass die Mehrheit $CD16^+$ und $CD6^+$ ist (69,2 \pm 12,03%), gefolgt von $CD16^-$ und $CD6^-$ (21,5 \pm 11,08%) NK-Zellen.

Anders als NK-Zellen, exprimieren nahezu alle T-Zellen (99,6 \pm 0,44) CD6 auf ihrer Oberfläche. Dagegen sind die meisten T-Zellen $CD16^-$ (98,39 \pm 2,15%) (Abbildung 12/E/links), weshalb dieser Marker in den folgenden Abbildungen nicht weiter betrachtet wurde.

Anhand der CD56, CD16 und CD6 Expression können peripheren NK-Zellen von gesunden Spendern in drei Subpopulationen eingeteilt werden: $CD56^{bright}CD16^{dim}CD6^{neg}$, $CD56^{dim}CD16^+CD6^{neg}$ und $CD56^{dim}CD16^+CD6^{pos}$. Im Vergleich dieser Untergruppen zeigt sich eine signifikante Dominanz der $CD6^+CD56^{dim}CD16^+$ Zellen gegenüber den $CD6^-CD56^{dim}CD16^+$ gefolgt von den $CD56^{bright}CD16^{dim}CD6^-$ NK-Zellen. Im Vergleich zur heterogenen CD6 Expression auf $CD56^{dim}$ NK-Zellen tragen nahezu alle T-Zellen CD6, aber kein CD16 auf ihrer Oberfläche.

1.2 Expression verschiedener aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf peripheren NK- und T-Zellen

Die Oberflächenexpression von NK-Zell-Rezeptoren korreliert oft mit einer entsprechenden Effektorfunktion. Daher wurden die im vorhergehenden Abschnitt definierten NK-Zell-Populationen ($CD56^{\text{bright}}CD6^-$, $CD56^{\text{dim}}CD6^-$ und $CD56^{\text{dim}}CD6^+$) anhand weiterer Marker charakterisiert. Untersucht wurden sowohl aktivierende Rezeptoren, wie die natürlichen-zytotoxischen-Rezeptoren (*engl.: natural cytotoxicity receptors=NCR*) NKp46, NKp30 und NKp44 sowie NKG2D, aber auch inhibierende Rezeptoren, wie das Heterodimer CD94 und NKG2A. Die Expression der Marker auf NK- und T-Zellen von gesunden Spendern wurde außerdem im Hinblick auf die im zweiten Teil dieser Arbeit betrachteten NK und T-Zellen im Kontext der Autoimmunkrankheit Arthritis betrachtet.



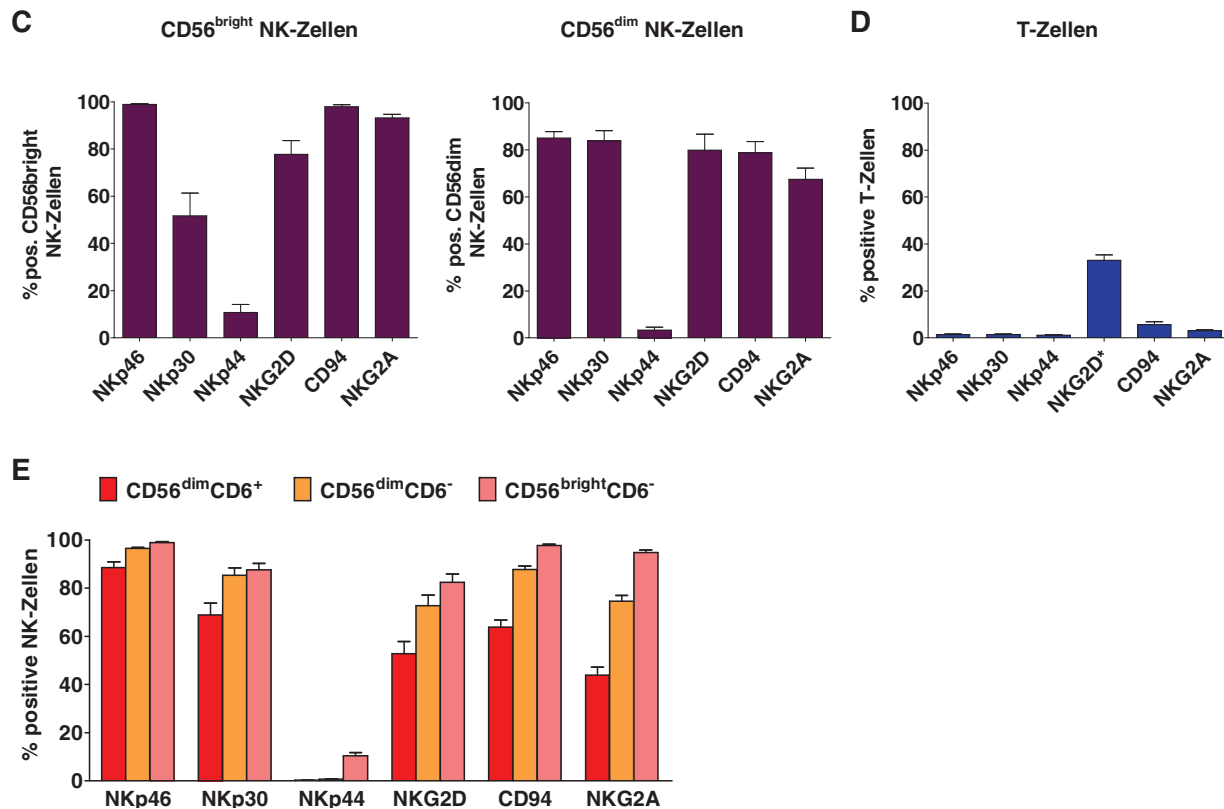


Abbildung 13: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf peripherer NK- und T-Zellen gesunder Spender.

Gezeigt ist eine exemplarische Färbung der NCR (NKp46, NKp30 und NKp44) sowie NKG2D, CD94 und NKG2A auf peripheren NK- (A) und T-Zellen (B) eines gesunden Spenders (Gatingstrategie wie in Abbildung 12 beschrieben). Da NKG2A Heterodimere mit CD94 bildet, sind diese in einem zusätzlichen Fenster dargestellt. In (C) ist die Expression der jeweiligen Marker unterteilt nach CD56^{bright} (links) und CD56^{dim} (rechts) NK-Zellen, bzw. T-Zellen (D) von 10 verschiedenen Spendern, in Prozent positiven Zellen dargestellt. In (E) sind die Prozent positive NK-Zellen einer anderen Normalspenderkohorte nach den in Abbildung 12 definierten NK-Subpopulationen CD56^{dim}CD6⁺ (rot), CD56^{dim}CD6⁻ (gelb) und CD56^{bright}CD6⁻ (rosa) gezeigt. Fehlerbalken sind in schwarz dargestellt. Zu E: CD94 (n = 13), NKG2A (n = 22), NKG2D (n = 10), NCR (n = 13).

Abbildung 13/A und B zeigt zunächst eine exemplarische Analyse der der Oberflächenmarker NKp46, NKp30 und NKp44, NKG2D, CD94 und NKG2A auf unstimulierten NK- und T-Zellen eines gesunden Spenders. Der prozentuale Anteil der positiven CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen, bzw. T-Zellen von 10 gesunden Spendern ist in Abbildung 13/C bzw. D zusammengefasst. Zusätzlich sind in Abbildung 13/E die Prozente der positiven Zellen (%) der in Abbildung 12 definierten NK-Subpopulationen CD56^{dim}CD6⁻ (gelb), CD56^{dim}CD6⁺ (rot) und CD56^{bright}CD6⁻ (rosa) von >10 gesunden Spendern dargestellt.

Periphere NK-Zellen gesunder Spender exprimieren alle der hier untersuchten Rezeptoren, (Abbildung 13f/A/C) jedoch in unterschiedlicher Dichte. So exprimieren nahezu alle CD56^{bright} NK-Zellen den aktivierenden Rezeptor NKp46 (98,9±0,8%) und das inhibierende Heterodimer CD94/NKG2A (97,9±2,9% bzw. 93,1±4,8%). Mit 85,1±8,7% bzw. 78,8±14,9% und 67,4±15,4% sind auch die meisten CD56^{dim} NK-Zellen NKp46, CD94 und NKG2A positiv, wenn auch in geringerem Umfang. NKG2D, eine ebenfalls aktivierender Rezeptor ist dagegen auf beiden

NK-Subpopulationen gleich verteilt ($CD56^{\text{bright}}$: $79,5 \pm 18,6\%$, $CD56^{\text{dim}}$: $77,6 \pm 20,7\%$). NKp30 ist ein heterogener Marker, der sowohl von $CD56^{\text{dim}}$ als auch von $CD56^{\text{bright}}$ NK-Zellen exprimiert wird, dabei gibt es spenderabhängig jedoch unterschiedliche Expressionsmuster, die zu einer unterschiedlichen mittleren-Expressionsdichte zwischen den beiden Kohorten führt (Abbildung 13 C und E). Das dritte Mitglied der NCR-Familie ist NKp44, welches erst nach vorangegangener Stimulation (z.B. durch IL-2) von NK-Zellen exprimiert wird. Da die hier untersuchten Zellen jedoch aus frisch isoliertem Blut untersucht wurden überrascht es nicht, dass nur $10,7 \pm 10,8\%$ der $CD56^{\text{bright}}$ und $3,4 \pm 2,4\%$ der $CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen diesen Aktivierungsmarker exprimieren.

Die Verteilung der Marker ist in Abbildung 13/E differenzierter dargestellt, da hier die Expression der Marker auf den drei NK-Fraktionen $CD56^{\text{dim}}CD6^+$, $CD56^{\text{dim}}CD6^-$ und $CD56^{\text{bright}}CD6^-$ (Abbildung 12, Seite 55) untersucht wurde. Im Vergleich der verschiedenen Fraktionen wird ebenfalls deutlich, dass die Expressionsdichte von CD94 auf $CD56^{\text{bright}}CD6^-$ NK-Zellen am höchsten ist und außerdem von $CD56^{\text{dim}}CD6^-$ hin zu den $CD56^{\text{dim}}CD6^+$ abnimmt (Vergleich aller Subpopulationen gegeneinander $p < 0,0001$). Dieses Muster wiederholt sich mit der Expression der anderen c-Typ-Lektin-Rezeptoren NKG2A ($p < 0,0001$) und NKG2D. Die beiden Mitglieder der NCR-Familie NKp30 und NKp46 sind dagegen nahezu gleich auf den $CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen verteilt, unabhängig davon ob die Zellen CD6 exprimieren oder nicht. Ein größerer Unterschied liegt jedoch zwischen den $CD6^+$ und negativen NK-Zellen vor. So exprimiert die $CD56^{\text{dim}}CD6^+$ Fraktion weniger NKp46 und NKp30 als die $CD56^{\text{dim}}CD6^-$ und die $CD56^{\text{bright}}CD6^-$ NK-Zellen. NKp44 ist ein Aktivierungsmarker, der von NK-Zellen erst nach Stimulation mit IL-2 exprimiert wird [93]. Da die hier untersuchten Zellen frisch aus dem Blut der Spender isoliert wurden, sind alle drei Subpopulationen NKp44⁻. Lediglich in der $CD56^{\text{bright}}CD6^-$ Fraktion zeigt sich eine geringere NKp44 Expression.

Wie erwartet gibt es keine T-Zell-Populationen, die einen der NCR-Rezeptoren exprimieren (NKp46: $1,4 \pm 0,7$, NKp30: $1,3 \pm 0,9$, NKp44: $1,1 \pm 0,8$) [93-95]. Anders ist es bei NKG2A und CD49, die zwar von den meisten NK-Zellen exprimiert werden, jedoch von nur wenigen T-Zellen ($3,1 \pm 1,2\%$ bzw. $5,7 \pm 3,5\%$). Dagegen sind 33% aller T-Zellen ($SD = 7,4\%$) NKG2D⁺. Betrachtet man diese T-Zellen genauer fällt auf, dass die Anwesenheit von NKG2D mit der Expression von CD8 korreliert (Daten nicht dargestellt). Dies bedeutet, dass humanes NKG2D, im Gegensatz zu murinem NKG2D konstitutiv auf CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird.

NK-Zellen exprimieren alle der hier untersuchten Oberflächenrezeptoren in unterschiedlicher Dichte. Dabei zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den $CD56^{\text{dim}}$ und $CD56^{\text{bright}}$ NK-Zellen bzw. zwischen den drei Subpopulationen $CD56^{\text{dim}}CD6^-$, $CD56^{\text{dim}}CD6^+$ und $CD56^{\text{bright}}CD6^-$. T-Zellen exprimieren aus dieser Rezeptorauswahl vor

allem auf CD8+ ZTL NKG2D. NKG2A und CD94 werden, entgegen der hohen NK-Zell-Expression, nur von sehr wenigen T-Zellen exprimiert.

1.3 Expression der CD6 Δ d3-Splicevariante in der Leukämiezelllinie NKL und in primären NK-Zellen

CD6 ist ein Typ B Scavenger-Rezeptor, der zunächst auf T-Zellen und später in unserem Labor auf NK-Zellen beschrieben wurde. Das 25 kb lange CD6 Gen besteht aus 13 Exons. Davon codieren Exon 1 und 2 für die Signalsequenz, Exon 3-5 die drei SRCR-Domänen (engl.: scavenger receptor *cysteine-rich*), Exon 6 einen kurzen „Stalk“ zwischen den SRCR-Domänen und der Transmembrandomäne (Exon 7) und Exon 8-13, für den intrazellulären Teil des CD6 Proteins (Abbildung 5, Seite 18). Besonders hervorzuheben ist die SRCR-3 Domäne (Exon 5), die als Bindestelle des CD6 Liganden ALCAM beschrieben wurde [96]. Neben fünf Splicevarianten, bei denen verschiedene Exons der zytoplasmatischen Region fehlen (CD6 Δ Ex8, CD6 Δ Ex8+9, CD6 Δ Ex8+12, CD6 Δ Ex9+12) wurde eine weitere Splicevariante beschrieben, der Exon 5 und damit die ALCAM-Bindestelle (CD6 Δ d3, *d3 steht für SRCR-domain-3*) fehlt [97, 98]. Castro et.al. konnten zeigen, dass das CD6-Gesamttranskript in humanen T-Zellen nach Aktivierung durch die CD6 Δ d3-Splicevariante ersetzt wird [96]. Mit dieser Beobachtung haben sie einen, zu den klassischen Aktivierungsmarkern CD25 und CD69, alternativen Weg zur Bestimmung des Aktivierungsstatus von T-Zellen gefunden. Um zu untersuchen ob diese aktivierungsabhängige m-RNA-Regulation auch bei NK-Zellen zu finden ist, wurde der NK-Tumorzelllinie NKL, welche in Anwesenheit von IL-2 kultiviert wird, für 24 Stunden IL-2 entzogen (unstimuliert). Mit dem Primerpaar: 5'dD3_2 (5'-GGATCAGTGTGCGATGACA-3', Exon 4=SRCR2 Domäne) und 3'_CD6_D (5'-GAGGAGGTCCAGCAAAGC-3', Exon 10=zytoplasmatischer Bereich) wurde mit der cDNS aus konstitutiv-IL-2-stimulierten und 24 Stunden „ausgehungerten“ NKL-Zellen ein Teil des CD6-Transkripts amplifiziert.

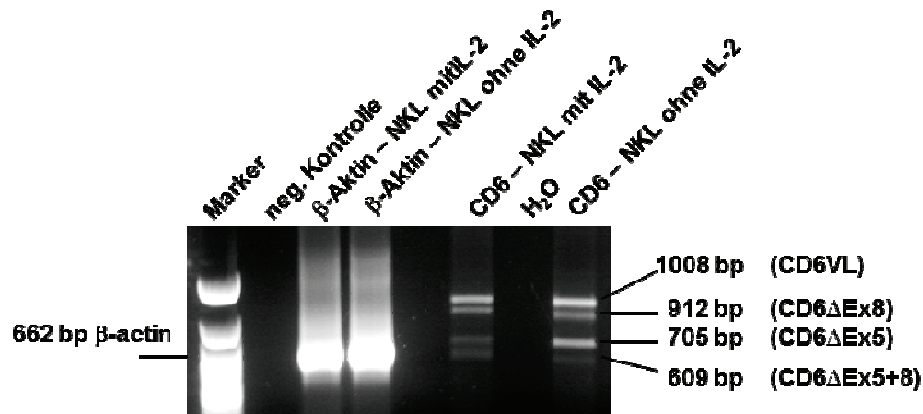


Abbildung 14: PCR zur Amplifizierung der CD6 Splicevarianten aus NKL.

In der PCR wurde cDNS aus NKL-Zellen eingesetzt, die in Anwesenheit von IL-2 kultiviert wurden oder denen IL-2 für 24 Stunden entzogen wurde. Als Negativkontrolle wurde ein PCR-Ansatz mit H₂O aufgetragen und um die Quantität der cDNS zu überprüfen wurde das Haushaltsgen β -Aktin mitgeführt. Vom Amplifikat wurden 10 μ l auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Anhand der Größe konnten 4 alternative Transkripte identifiziert werden: CD6VL (1008 bp), CD6 Δ Exon8 (912 bp), CD6 Δ Exon5 (705 bp) und CD6 Δ Exon5/8 (609 bp). Die Größen der Markerfragmente sind seitlich in Basenpaaren angegeben. Die Sequenzen der CD6 Splicevarianten mit den Primer-Bindestellen befinden sich im Anhang (Abbildung 37, Seite 142)

In der elektrophoretischen Auftrennung der CD6-PCR Amplifikate erscheinen sowohl bei den stimulierten, als auch bei den unstimulierten NKL-Zellen Banden in unterschiedlicher Stärke (Abbildung 14). So können jeweils vier Banden bei einer Größe von 1008 bp, 912 bp, 705 bp und 609 bp identifiziert werden, welche mit den erwarteten Größen übereinstimmen. Die Banden wurden einzeln ausgeschnitten und die eluierten Amplifikate zum Sequenzieren an die Firma Sequiserve (Vaterstetten) geschickt. Eine sinnvolle Editierung der 912 bp Bande (NKL ohne IL-2) und 609 bp Bande (NKL mit IL-2) war laut *Sequiserve* nicht möglich. Ein Vergleich der anderen Sequenzen mit der Referenzsequenz NM_006725.3 ergab jedoch, dass die 1008 bp Bande den kompletten Abschnitt des CD6-Gesamttranskriptes darstellt, die 912 bp Bande eine CD6 Splicevariante, der Exon 8 fehlt, die 705 bp Bande eine CD6 Splicevariante, der Exon 5 fehlt und die 609 bp Bande eine CD6 Splicevariante der sowohl Exon 5 als auch Exon 8 fehlt. Damit konnte hier gezeigt werden, dass die NK-Leukämiezelllinie NKL ebenfalls die beschriebenen Splicevarianten CD6 Δ Ex8 und CD6 Δ Ex5 (CD6 Δ d3) exprimiert. Zusätzlich, zu den bereits beschriebenen Splicevarianten wurde jedoch eine weitere Splicevariante gefunden, die weder Exon 5 noch Exon 8 (CD6 Δ Ex5+8) enthält. Obwohl alle vier Amplifikate sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten NKL-Zellen gefunden wurden, zeigen sich Intensitätsunterschiede. Im Gegensatz zu dem Befund von Castro et.al. befindet sich in den NKL, denen IL-2 für 24 Stunden entzogen wurde mehr CD6 Δ d3 (CD6 Δ Ex5) Amplifikat als in denen die wie üblich in Anwesenheit von IL-2 kultiviert wurden. Des Weiteren kann hier nicht der Befund bestätigt werden, dass die CD6 Δ d3-Splicevariante das volle Länge CD6-Transkript ersetzt, da beide Transkripte gleich stark amplifiziert wurden. Die Splicevariante CD6 Δ Ex8 wird von NKL-Zellen mit und ohne IL-2 in

gleicher Intensität exprimiert, ebenso wie die Splicevariante CD6 Δ Ex5+8, die allerdings schwächer exprimiert wird als die CD6 Δ Ex8 Splicevariante. In den mit IL-2 kultivierten NKL-Zellen zeigt sich am deutlichsten die Bande des Gesamtlänge-CD6-Transkripts, gefolgt von der Splicevariante der Exon 8 fehlt.

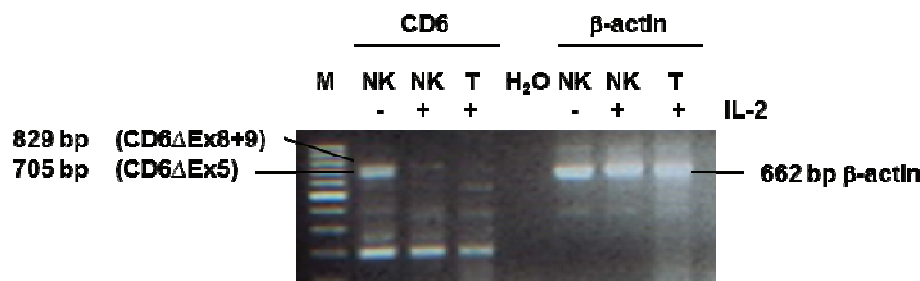


Abbildung 15: PCR zur Amplifizierung der CD6 Splicevarianten aus primären NK-Zellen.

Dargestellt ist eine PCR mit der cDNS aus peripheren NK-Zellen eines gesunden Spenders, die entweder frisch (NK-), oder nach drei Tagen in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml) amplifiziert wurden (NK+). Um die Splicevarianten in den T-Zellen zu analysieren, wurde ein allospezifischer CD8 T-Zellklon mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde ein PCR-Ansatz mit H₂O aufgetragen. Die Quantität der cDNS wurde durch das Haushaltsgen β -Aktin überprüft. Vom Amplifikat wurden 10 μ l auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Anhand der Größe konnten zwei alternative Transkripte identifiziert werden: CD6 Δ Exon8+9 (829 bp) und CD6 Δ Exon5 (705 bp). Die Größen der Markerfragmente sind rechts und links in Basenpaaren angegeben.

In Abbildung 15 wurde der Einfluss von IL-2 auf das Splicemuster des CD6 Transkripts primärer NK-Zellen untersucht. Dazu wurde ein Teil von frisch isolierten NK-Zellen für drei Tage in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml) kultiviert und anschließend die cDNS isoliert. Aus dem anderen Teil wurde die cDNS frisch gewonnen (unstimuliert). Da für T-Zellen bereits verschiedene Splicevarianten publiziert sind, wurde hier ebenfalls ein allospezifischer CD8⁺-T-Zellklon mitgeführt.

Bei keiner der cDNS Proben konnte ein Gesamtlänge-Transkript amplifiziert werden (Abbildung 15). Die Splicevariante Δ D3 (CD6 Δ Exon5 bei 705bp) erscheint dagegen bei allen untersuchten Zellen, jedoch am deutlichsten in den frisch isolierten und damit unstimulierten NK-Zellen. Dieses Ergebnis steht entgegen der Beobachtung in T-Zellen, dass die Δ D3 Splicevariante, nach Aktivierung das Gesamtlänge-Transkript ersetzt. Jedoch folgt diese Beobachtung dem Ergebnis aus der PCR mit den NKL-Zellen, in der diese Splicevariante ebenfalls am prominentesten in den unstimulierten NKL auftrat. Des Weiteren zeigt sich, in gleicher Intensität, direkt über dem CD6 Δ Exon5-Fragment eine Bande, in der sowohl Exon 8 als auch Exon 9 fehlt.

Unter den hier verwendeten PCR-Bedingungen wurden sowohl in IL-2 stimulierten, als auch in unstimulierten Zellen der NK-Tumorlinie NKL drei unterschiedliche CD6 Splicevarianten (CD6 Δ Ex8, CD6 Δ Ex5 und CD6 Δ Ex5+8) neben dem CD6-

Gesamttranskript gefunden. In primären NK-Zellen aus dem Blut gesunder Spender konnte dieses Gesamttranskript nicht amplifiziert werden. Dennoch zeigte sich, wie bei den NKL-Zellen, die Splicevariante CD6 Δ Ex5 und am deutlichsten in den unstimulierten NK-Zellen. Darüber hinaus wurden die Splicevariante CD6 Δ Ex8+9 gefunden. Damit konnte der Austausch des CD6-Gesamttranskripts durch die CD6 Δ Ex5 Splicevariante, bei stimulierten NK-, NKL- und T-Zellen, wie sie für T-Zellen publiziert wurde, so nicht bestätigt werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass auch in NK-Zellen Spleißvarianten von CD6, abhängig vom Stimulationszustand, gebildet werden und CD6 somit zu den komplex regulierten Genen zählt.

1.4 Darstellung der Degranulationsfähigkeit von NK- und T-Zellen im Hinblick auf die CD6 Expression

Die wesentlichen Effektorfunktionen von NK- und T-Zellen sind die Zytotoxizität (bei T-Zellen CD8⁺) und die Freisetzung von Zytokinen (bei T-Zellen CD4⁺). Da die Funktion von CD6 auf NK-Zellen bisher weitgehend unbekannt ist, sollte hier untersucht werden ob NK-Zellen nach CD6-Rezeptorstimulation degranulieren können. Da auch T-Zellen CD6 exprimieren, wurde ihr Degranulationsverhalten nach CD6-Stimulation ebenfalls untersucht. Dazu wurde zunächst die Degranulationsfähigkeit der NK- und T-Zellen in Anwesenheit von HLA-Klasse-I negativen Tumorzellen, mit unterschiedlicher Expression des CD6 Liganden ALCAM (CD166) untersucht. Und anschließend die Auswirkungen der rezeptorspezifischen CD6-Stimulation, auch im Hinblick auf eine mögliche kostimulierende Funktion betrachtet.

1.4.1 Einfluss der ALCAM-Expression HLA-Klasse-I negative Tumorzellen auf das Degranulationsverhalten von NK- und T-Zellen

Das Adhäsionsmolekül ALCAM (CD166) ist einer der CD6-Liganden. Um einen möglichen funktionellen Einfluss der ALCAM-CD6 Interaktion von NK- und T-Zellen mit verschiedenen Zielzellen zu untersuchen, wurde deren ALCAM Expressionsstatus bestimmt.

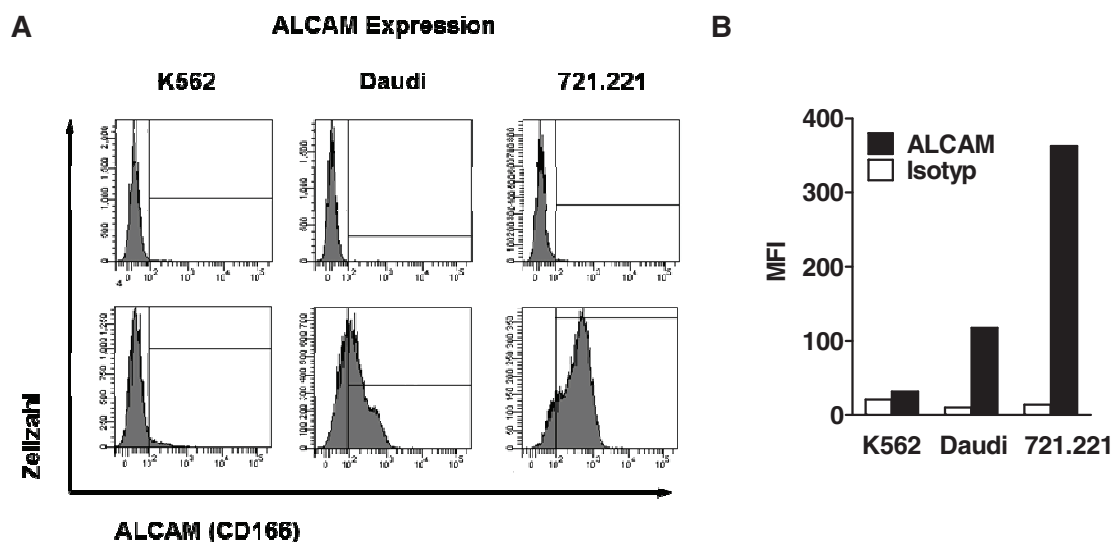


Abbildung 16: Oberflächenexpression von ALCAM auf den HLA-Klasse-I negativen Tumorzelllinien K562, Daudi und 721.221.

(A) Gezeigt ist die Menge an ALCAM (graue Kurven) auf der Oberfläche der Tumorzelllinien K562, Daudi und 721.221. Der „T-Balken“ zeigt die Lage des Isotyp-Antikörpers an. (B) Da in der FACSDiva Software keine Überlagerung des Isotyps über die positiv gefärbte Probe möglich ist, sind die MFI (engl.: median fluorescence intensities) des Isotyp-Antikörpers neben den positiv gefärbten ALCAM Probe dargestellt.

In Abbildung 16 ist die Zellzahl gegen die ALCAM-Expression als Histogramm dargestellt. Es zeigt sich, dass die humane erythromyeloblastoide Leukämiezelllinie K562 ALCAM-negativ ist. Die EBV transformierte B-Zelllinie 721.221 zeigt hingegen eine starke ALCAM-Expression und die Burkitt-Lymphomzelllinie Daudi eine Mittlere ALCAM Expression.

1.4.2 Degranulation von NK- und T-Zellen in Anwesenheit von HLA-Klasse-I negativen Zielzellen

Um zu untersuchen, ob die Stimulation von CD6 auf NK- und T-Zellen zu einer Aktivierung und damit zur Degranulation der Zellen führt, wurde ein CD107a Degranulationsversuch durchgeführt. Dazu wurden IL-2 stimulierte PBMC eines gesunden Spenders mit den HLA-Klasse-I negativen Tumorzelllinien K562, Daudi und 721.221 und einem CD107a spezifischen Antikörper für 4 Stunden kokultiviert. Die anschließende Gegenfärbung mit CD3, CD56, CD6 und CD16 erlaubt es, die CD107a Expression und damit die Degranulation von NK- und T-Zellen und ihrer Subpopulationen darzustellen. Wie in Abschnitt D.3.1.1 (Seite 47) beschrieben erscheint CD107a, durch die Fusion intrazellulärer Vesikel mit der Zellmembran, auf der Oberfläche zytotoxischer Zellen und kann daher als Indikator für die Degranulationskapazität verwendet werden.

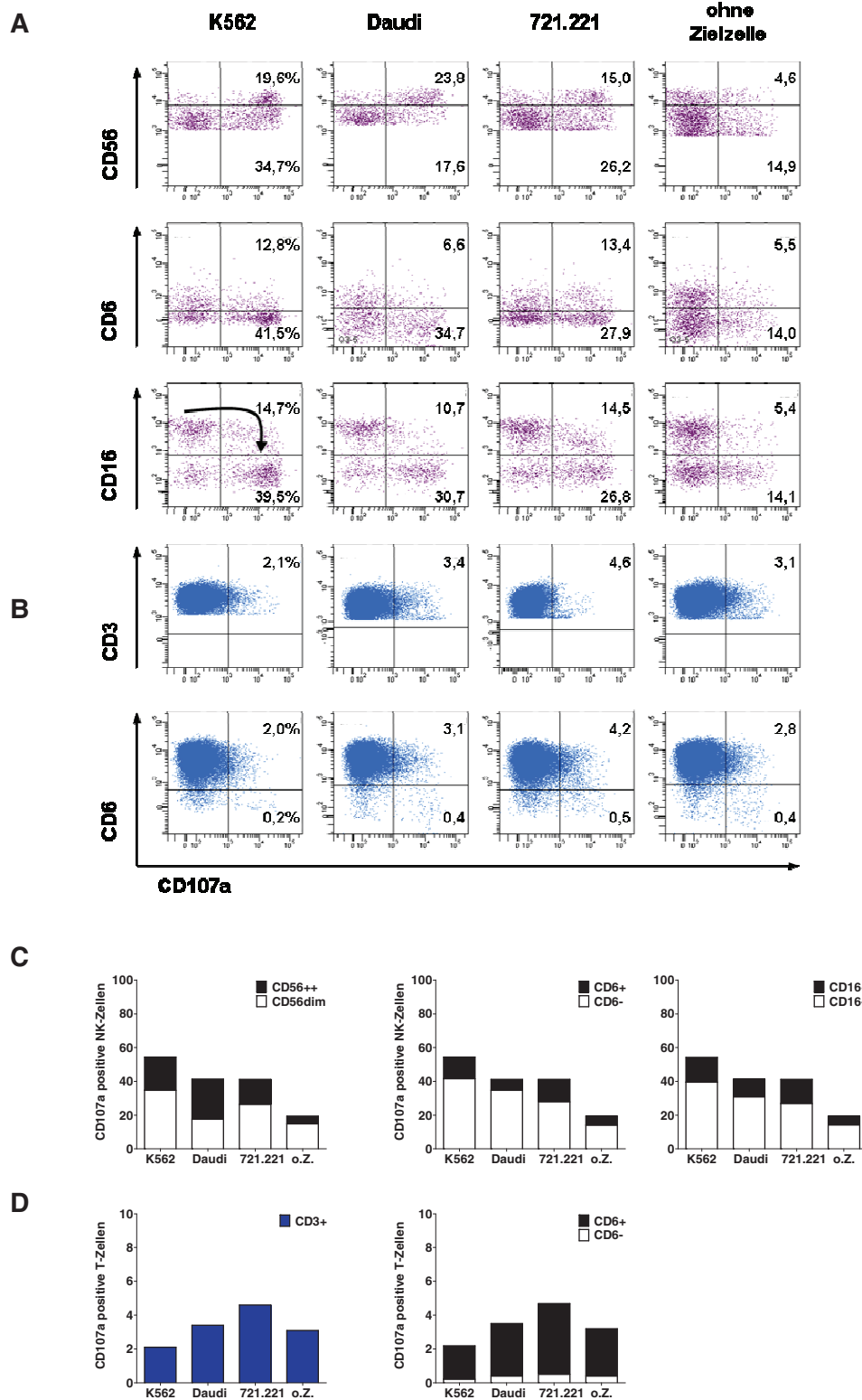


Abbildung 17: Degranulation von peripheren NK- und T-Zellen aus PBMC eines gesunden Spenders in Anwesenheit von HLA-Klasse-I negativen Zielzellen.

Die PBMC (Effektorzellen) wurden 48 Stunden mit IL-2 (500 U/ml) vorstimuliert. Anschließend wurden sie für 4 Stunden mit den Zielzellen (K562, Daudi und 721.221) im Verhältnis 3:1 (E:Z) und dem CD107a Antikörper bei 37°C inkubiert. Um die spontane Degranulation der Zellen zu erfassen wurde ein Ansatz ohne Zielzellen mitgeführt. Zur Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen wurde mit CD56, CD3, CD6 und CD16 Antikörpern gegengefärbt. Für die separate Darstellung der NK- und T-Zellen (A und B) wurde die gleiche Auswertestrategie angewendet wie sie in Abbildung 12 beschrieben ist. Für NK-Zellen (lila in A) wurde die CD107a Expression gegen die Marker CD56, CD6 und CD16 aufgetragen und für T-Zellen (blau in B) die CD107a Expression gegen die Marker CD3 und CD6. Der Pfeil gibt die Richtung der CD16-Rezeptormodulation während der Degranulation von NK-Zellen an. Unter C und D ist die Quantifizierung der CD107a positiven NK-Zellen gemäß ihrer $CD56^{bright}/CD56^{dim}$,

CD6⁺/CD6⁻ und CD16⁺/CD16⁻ Expression dargestellt (oben, von links nach rechts). Darunter ist die Quantifizierung aller CD107a positiven T-Zellen nach ihrer CD3 (links) oder CD6⁺/CD6⁻ (rechts) Expression gezeigt. Dargestellt ist die Degranulation von peripheren NK- und T-Zellen eines gesunden Spenders, repräsentativ für n=3 Spender PBMC.

In Abbildung 17 ist die Analyse der CD107a Expression von NK-Zellen und T-Zellen nach 4 Stunden Koinkubation mit den HLA-Klasse-I negativen Zelllinien gezeigt. Dabei ist unter A die durchflusszytometrische Analyse der CD107a positiven NK-Zellen (lila) gemäß ihrer CD56, CD16 und CD6 Expression und unter B die CD107a Expression der T-Zellen gemäß ihrer CD3 und CD6 Expression dargestellt. In C und D sind die prozentualen Werte der CD107a positiven Zellen zusammen gefasst. Um die Degranulationsfähigkeit beider NK-Subpopulationen zu vergleichen, sind diese getrennt dargestellt. Stellt man die CD56 Expression der von CD107a auf NK-Zellen gegenüber (Abbildung 17/A und C) so zeigt sich im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Zielzellen mit allen drei Zelllinien eine deutliche Degranulation beider NK-Subpopulationen. In der Mitte von Abbildung 17/A sind die NK-Zellen nach ihrer CD6/CD107a Expression aufgetragen. Sowohl CD6⁺ als auch CD6⁻ NK-Zellen degranulieren in Anwesenheit der drei Zielzellen. Die CD6 Expression scheint also keinen Einfluss auf das Degranulationsverhalten von NK-Zellen zu haben. Die unterschiedlich starke Expression des CD6-Liganden ALCAM auf den verschiedenen Zielzellen führt zu keinem Unterschied im Bezug auf die NK-Zell-Degranulation. Dies zeigt sich durch den Vergleich der CD56⁺/CD6⁺/CD107a⁺ NK-Zellen nach Inkubation mit den jeweiligen Zielzellen. Wie in Abbildung 16 gezeigt wurde, exprimiert die K562-Zelllinie kein ALCAM, dennoch degranulieren auf ihren Stimulus hin 12,8% der CD56⁺/CD6⁺ NK-Zellen, auf die schwach ALCAM-positive Zelllinie Daudi jedoch nur 6,6%. Und im Vergleich zur stark ALCAM-positiven Zelllinie 721.221 degranulieren nur 0,6% mehr CD56⁺/CD6⁺ NK-Zellen (insg. 13,4%) als mit K562. In der untersten Reihe der NK-Zellen sind diese nach ihrer CD16/CD107a Expression aufgetragen. Da es kaum CD16/CD107a doppelt positive Zellen gibt, lässt sich daraus schließen, dass die CD16⁺ NK-Zellen mit der Degranulation ihren CD16 Rezeptor verlieren. Stattdessen kommt es zu einer Abnahme der CD16⁺/CD107a⁻ NK-Zellen und gleichzeitig zu einer Zunahme der CD16⁻/CD107a⁺ NK-Zellpopulation.

Betrachtet man die CD107a Degranulation von T-Zellen, so zeigt sich im Vergleich zur spontanen Degranulation ohne Zielzellen keine erhöhte Degranulation in Anwesenheit von Zielzellen. Da die hier verwendeten Zielzellen keine HLA-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen, war dies zu erwarten. Ein direkter Einfluss von CD6 auf das Degranulationsverhalten von T-Zellen kann nicht beobachtet werden, da die spontane CD107a Expression sowohl bei CD6⁻ als auch bei den CD6⁺ T-Zellen zu beobachten ist.

1.4.3 Degranulation von NK- und T-Zellen nach direkte CD6 Rezeptorstimulation

Um zu untersuchen ob es bei NK- und T-Zellen durch die rezeptorspezifische Stimulation von CD6 zur Degranulation kommt, wurden unstimulierte PBMC eines gesunden Spenders mit rezeptorspezifischen Antikörpern gegen den CD6-Rezeptor, die aktivierenden Rezeptoren CD16 und NKp46 und die Isotypkontrolle MOPC21 stimuliert. Dazu wurden diese Antikörper auf einer 96-Lochplatte immobilisiert und nach vier Stunden Stimulation in Anwesenheit eines CD107a-Antikörpers mit den Antikörpern CD56, CD6, CD16 und CD3 gegengefärbt. Durch eine durchflusszytometrische Analyse konnten so die NK- und T-Zellen separat nach ihrer CD107a-Expression in Bezug zur Expression der Oberflächenrezeptoren CD56, CD6 und CD16 bei NK-Zellen (Abbildung 18/A) und CD3 sowie CD6 bei T-Zellen (Abbildung 18/B) betrachtet werden.

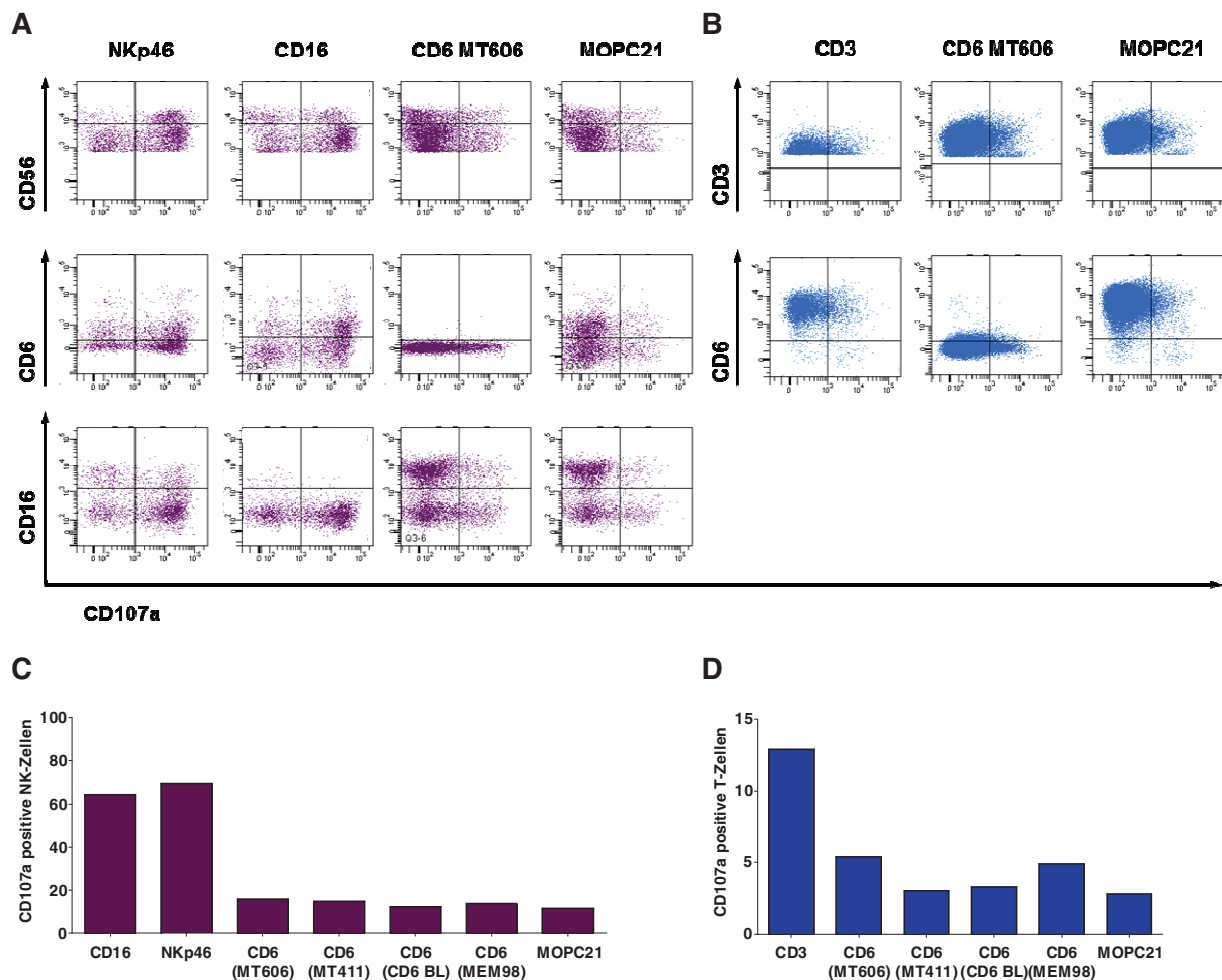


Abbildung 18: Degranulation von peripheren NK- und T-Zellen aus PBMC von gesunden Spendern nach Stimulation mit rezeptorspezifischen Antikörpern.

PBMC wurden 48 Stunden mit IL-2 (500 U/ml) vorstimuliert. Anschließend wurden sie für 4 Stunden in eine mit Antikörpern gekoppelte 96-Lochplatte gegeben und mit dem CD107a Antikörper bei 37°C inkubiert. Um die spontane Degranulation der Zellen zu erfassen wurde ein Ansatz mit dem Isotyp-Antikörper MOPC21 mitgeführt. Zur Unterscheidung der einzelnen Populationen wurde mit CD56, CD3, CD6 und CD16 Antikörpern gegengefärbt. Für die separate Darstellung der NK- und T-Zellen (A und B) wurde die gleiche Auswertestrategie angewendet wie sie in Abbildung 12 beschrieben ist. Für NK-Zellen (Iila in A) wurde die

CD107a Expression gegen die Marker CD56, CD6 und CD16 aufgetragen und für T-Zellen (blau in B) die CD107a Expression gegen die Marker CD3 und CD6 dargestellt. Unter (C) ist die Quantifizierung der gesamt CD107a positiven NK-Zellen (links) und T-Zellen (rechts) dargestellt. Zusätzlich zu den in A und B dargestellten Stimulationsantikörpern CD6 (Klon MT606), NKp46, CD16 und CD3 sind hier weitere CD6-Klone (MT411, CD6 BL und MEM98) dargestellt. Gezeigt ist eines von drei Experimenten.

Da CD16 und NKp46 stark aktivierende Rezeptoren sind, zeigt sich nach deren Stimulation eine deutliche CD107a-Expression (64,4% mit CD16 und 69,3% mit NKp46) im Vergleich zu der Stimulation mit der Isotypkontrolle MOPC21. Wie in der Darstellung der CD56⁺ NK-Zellen gegen CD107a gezeigt ist, bezieht sich diese starke Degranulation nicht allein auf die CD56^{dim} Zellen, sondern ebenso auf die CD56^{bright} Subpopulation. Die Stimulation mit dem MOPC21 Isotyp-Antikörper gibt mit 11,7% die Anzahl der spontan degranulierenden NK-Zellen an. Im Vergleich dazu degranulieren nur 16,1% der NK-Zellen nach Stimulation des CD6-Rezeptors (Klon MT606). Um zu untersuchen, ob eine Degranulation von NK-Zellen durch Stimulation eines anderen CD6 Epitops ausgelöst werden kann, wurden zusätzlich verschiedene CD6-Klone getestet (MT411, CD6 BL und MEM98). Auch hier konnte kaum eine vermehrte Degranulation, im Vergleich zur Isotypkontrolle, beobachtet werden. Des Weiteren wurde die CD107a-Expression gegen die CD6-Expression der NK-Zellen betrachtet. Dabei fällt zunächst auf, dass NK-Zellen, die mit einem Antikörper gegen CD6 stimuliert wurden, kein positives CD6-Signal mehr zeigen. Dieser Effekt kann damit erklärt werden, dass die Bindestelle für den fluoreszenzmarkierten Antikörper mit der des Stimulations-Antikörpers überlappt, wodurch eine sterische Hinderung entsteht. Bei der Betrachtung der NKp46- und CD16-Rezeptor stimulierten NK-Zellen ist kein Unterschied im Degranulationsverhalten zwischen den CD6⁺ und CD6⁻ Zellen zu beobachten, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass eine Stimulierung des CD6 Rezeptors nicht zur Degranulation von NK- oder T-Zellen führt. In der CD107a gegen CD16-Darstellung ist ebenfalls der Effekt der sterischen Hinderung, hier durch die beiden CD16 Antikörper, zu beobachten. Darüber hinaus zeigt sich, dass sowohl die CD16⁺ als auch die CD16⁻ NK-Zellen degranulieren. Dies bestätigt ebenfalls, dass sowohl die CD16⁺ CD56^{dim} NK-Zellen degranulieren wie auch die CD56^{bright} Zellen, die kein CD16 exprimieren. In Abbildung 18/B ist die CD107a Expression der rezeptorstimulierten T-Zellen dargestellt. Der obere Abschnitt zeigt die Färbung gegen den CD3 Rezeptor. Wie auch bei NK-Zellen zeigt sich bei den T-Zellen, dass die Färbung des CD3 Rezeptors durch die vorhergehende Stimulation desselben verhindert ist. Dennoch ist zu sehen, dass die Stimulation der T-Zellen über den CD3ε-Rezeptor allein nur eine geringe Degranulation auslöst. Dies verwundert nicht, da T-Zellen zur vollständigen Aktivierung ein kostimulierendes Signal benötigen. Wie auch bei NK-Zellen wird bei T-Zellen keine Degranulation durch die CD6-Stimulation ausgelöst, unabhängig vom Epitop des CD6-Antikörpers (CD6-Klone: MT411, CD6 BL und MEM98).

Um zu untersuchen, ob der CD6 Rezeptor als Korezeptor zu einer erhöhten Degranulation bei NK- und T-Zellen führt, wurden PBMC eines gesunden Spenders mit IL-2 vorstimuliert und mit rezeptorspezifischen Antikörpern in An- und Abwesenheit eines anti-CD6 Antikörpers für vier Stunden in Anwesenheit eines Fluoreszenzmarkierten anti-CD107a Antikörpers stimuliert. In Abbildung 19 ist exemplarisch die CD107a Expression gegen CD16, NKp46 und CD6 für NK-Zellen (Abbildung 19/A) und gegen CD3 und CD6 für T-Zellen (Abbildung 19/B) dargestellt. Die CD107a-positiven NK-Zellen (Abbildung 19/C), getrennt nach CD56^{bright} und CD56^{dim}, sowie die T-Zellen (Abbildung 19/D) sind in einem Balkendiagramm zusammengefasst. Um die spontane Degranulation der Zellen zu erfassen, wurden die Zellen ebenfalls mit dem Isotyp-Antikörper MOPC21 stimuliert. Wie bereits in Abbildung 17 und Abbildung 18 gezeigt, degranulieren auch hier beide NK-Zell-Subpopulationen nach Stimulation der aktivierenden Rezeptoren. Eine mögliche kostimulierende Wirkung des CD6 Rezeptors kann hier jedoch nicht beobachtet werden, da keine erhöhte CD107a-Expression nach Kostimulation der aktivierenden Rezeptoren mit CD6 (dunkellila Balken) im Vergleich zur Stimulation der aktivierenden Rezeptoren allein (weiße Balken) beobachtet werden kann. Diese Beobachtung gilt sowohl für die CD56^{bright} als auch für CD56^{dim} NK-Zell-Population.

Auch bei den T-Zellen kann keine Kostimulation über den CD6 Rezeptor beobachtet werden. Denn auch hier steigt die Anzahl der CD107a-positiven T-Zellen nach Kostimulation mit CD6 (blaue Balken) im Vergleich zu Stimulation ohne CD6 (weiße Balken) nicht an. Anders als in Abbildung 17 zeigt sich hier eine stärkere CD107a-Expression mit durchschnittlich 37% der T-Zellen nach Stimulation des CD3 Rezeptors allein und nach Kostimulation mit CD6. Die Degranulation von T-Zellen durch die alleinige Stimulation des TCR findet auch in Abwesenheit eines kostimulierenden Moleküls statt und ist in der Intensität von Spender zu Spender unterschiedlich [88].

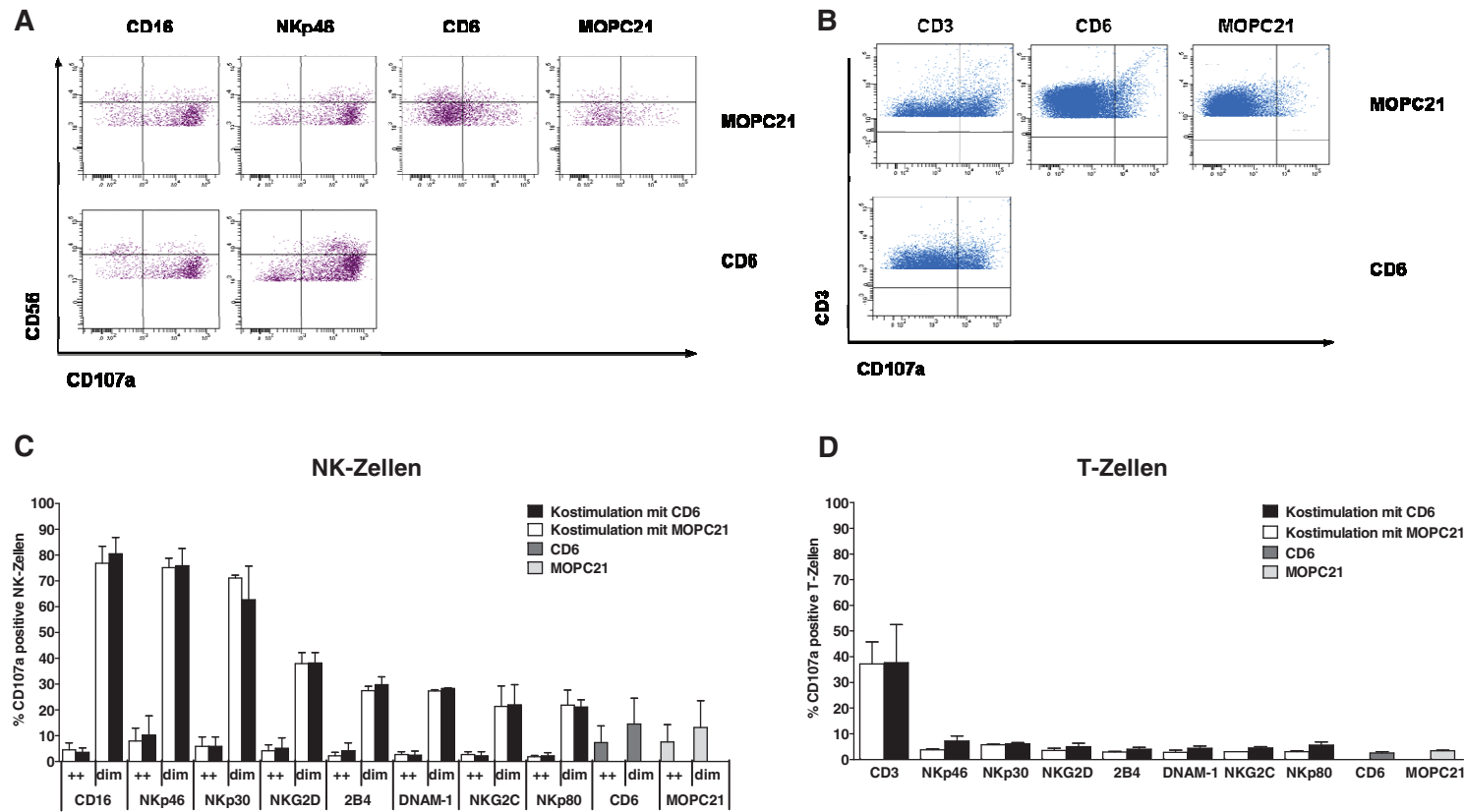


Abbildung 19: Degranulation von periphere NK- und T-Zellen aus PBMC eines gesunden Spenders nach Stimulation mit rezeptor-spezifischen Antikörpern in An- oder Abwesenheit eines CD6 spezifischen Antikörpern.

PBMC wurden 48 Stunden mit IL-2 (500 U/ml) vorstimuliert. Anschließend wurden sie für 4 Stunden in eine mit rezeptor-spezifischen Antikörpern, in An- oder Abwesenheit eines CD6 spezifischen Antikörpers, gekoppelte 96-Lochplatte und einem CD107a Antikörper bei 37°C inkubiert. Zur Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen wurde mit CD56, CD3, CD6 und CD16 Antikörpern gegengefärbt. Für die separate Darstellung der NK- und T-Zellen (A und B) wurde die gleiche Auswertestrategie angewendet wie sie in Abbildung 12 beschrieben ist. (C+D) Die Isotypkontrolle (MOPC21, grauer Balken) stellt die spontane Degranulation der NK- oder T-Zellen dar. Die farbigen Balken geben die gleichzeitige Stimulation mit den rezeptor-spezifischen Antikörpern und CD6 an. Als weiße Balken ist die gleichzeitige Stimulation mit dem Isotyp Antikörper MOPC21 gezeigt. C und D geben zwei repräsentative Experimente wieder.

Die Kokultivierung von NK-Zellen mit HLA-Klasse-I negativen Tumorzellen löst sowohl bei der CD56^{dim} als auch bei CD56^{bright} Subpopulation Degranulation aus. Dagegen konnte keine Degranulation von T-Zellen gegen diese Zellen beobachtet werden. Obwohl die Zielzellen den CD6 Liganden ALCAM in unterschiedlicher Intensität exprimieren, zeigte sich auch hier kein Unterschied in der Degranulationsfähigkeit der NK- und T-Zellen. Damit einhergehend war keine Degranulation durch die spezifische Stimulation von CD6 bei NK- und T-Zellen zu beobachten, auch nicht bei receptorspezifischer Stimulation von aktivierenden Rezeptoren in Anwesenheit von CD6 als möglicher kostimulierender Rezeptor. Zusammengenommen konnte daher gezeigt werden, dass die Stimulation von CD6 keine Degranulation bei NK- und T-Zellen auslöst.

1.5 Zytokin- und Chemokinfreisetzung von NK- und T-Zellen Rezeptorstimulation

In Abschnitt 1.4 konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des CD6 Rezeptors keine Degranulation bei NK-Zellen auslöst. Da aber die Signalwege für die beiden Effektorfunktionen Zytotoxizität und Zytokinproduktion nicht notwendigerweise parallel verlaufen [99], wurde im Folgenden untersucht, ob die Stimulation von CD6 zur Produktion von Zytokinen führt. Dazu wurde zunächst die rezeptorvermittelte Zytokinproduktion in An- und Abwesenheit von IL-2 untersucht und anschließend die Zytokinfreisetzung über die Zeit betrachtet. Anschließend wurde die direkte Zytokinfreisetzung ausgewählter Zytokine mittels intrazellulärer FACS-Färbung untersuchen.

1.5.1 Zytokin- und Chemokinfreisetzung von NK-Zellen nach CD6-Stimulation.

Für die Stimulation wurden zunächst NK-Zellen aus PBMC eines gesunden Spenders mit einer Reinheit von 99,5% isoliert und in eine 96-Loch-Platte mit immobilisierten Antikörpern gegen den aktivierenden CD16 Rezeptor, drei verschiedene CD6 Antikörper (MT606, MEM98 und CD6 BL) und die Isotypkontrolle MOPC21 gegeben. Die NK-Zellen wurden darin entweder ohne IL-2 (weiße Balken) oder mit 500 U/ml IL-2 im Medium (schwarze Balken) für 24 Stunden inkubiert und anschließend wurden mit Hilfe der Multiplex-Methode die Zytokin-Chemokinkonzentrationen im Medium quantifiziert (siehe D.5.2 und D.5.2).

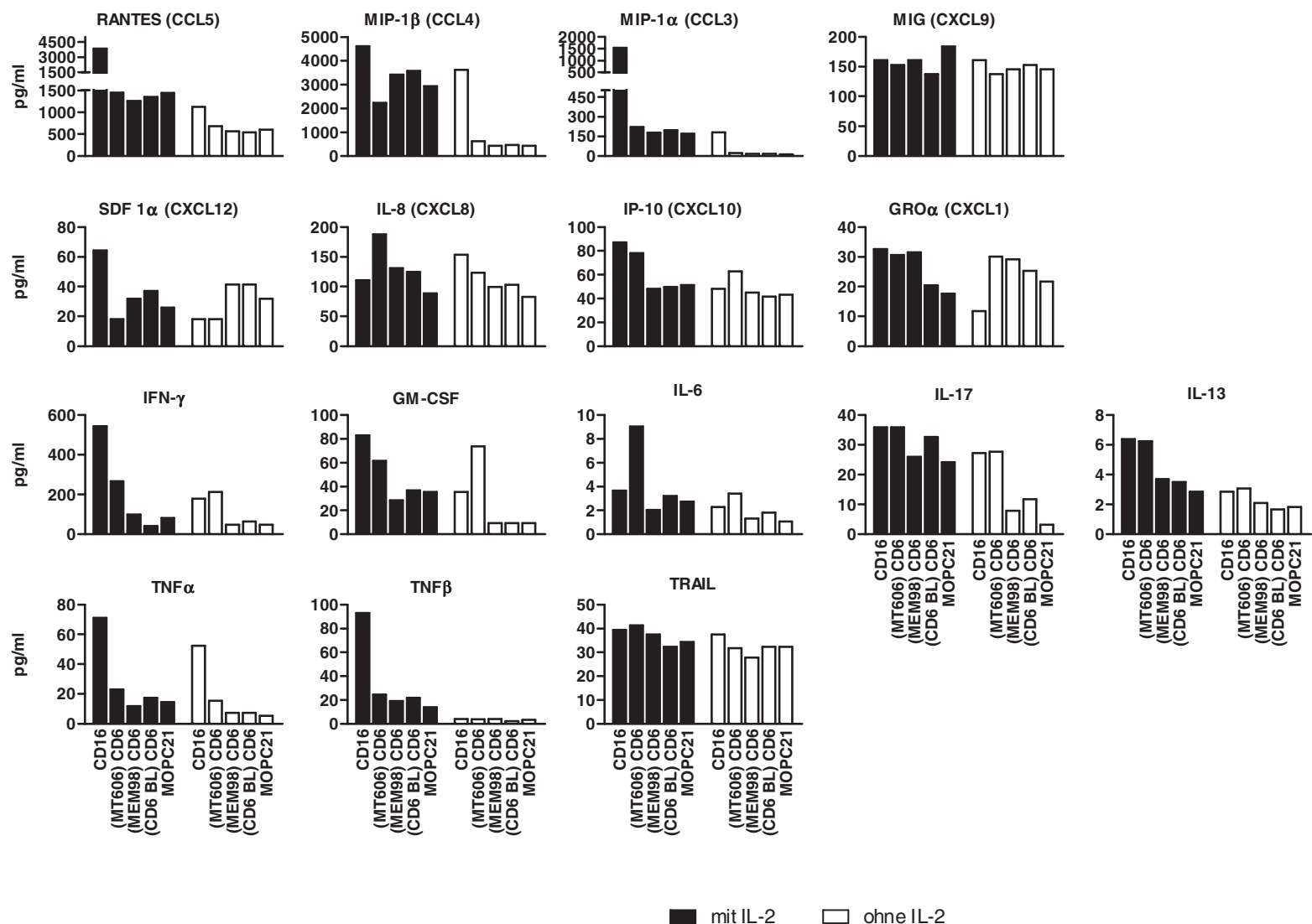


Abbildung 20: Chemokin- und Zytokinproduktion separierter NK-Zellen eines gesunden Spenders nach Rezeptorstimulation in An- und Abwesenheit von IL-2.

Separierte NK-Zellen mit einer Reinheit von 99,5% (CD3⁺/CD56⁺), wurden mit 10 μ g/ml plattengekoppelten Antikörpern gegen CD16, CD6 (MT606, MEM98 und CD6 BL) und MOPC21 (Isotypkontrolle) stimuliert. Die Stimulation von 100.000 NK-Zellen/Ansatz in einer 96 Loch-Platte erfolgte entweder in Anwesenheit von 500 U/ml IL-2 (schwarze Balken) oder in Abwesenheit von IL-2 (weiße Balken). Nach 24 Stunden wurde die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen im Zellkulturüberstand mit Hilfe der Multiplex Technologie quantifiziert (pg/ml). Gezeigt ist eines von drei repräsentativen Experimenten

In Abbildung 20 ist exemplarisch die rezeptorvermittelte Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen eines von drei Spendern dargestellt. Die schwarzen Balken zeigen die Menge der freigesetzten Proteine in pg/ml nach Rezeptorstimulation in Anwesenheit von IL-2 und die weißen Balken die Menge in Abwesenheit von IL-2. Gleichzeitig ist die Kontrollstimulation mit Isotyp-Antikörpern dargestellt, um einen Nebeneffekt der Antikörper über die Bindung an den Fc-Rezeptoren zu messen, bzw. um die nur durch IL-2 induzierten Zytokine nachzuweisen. Der CD16-Rezeptor der NK-Zellen wurden ebenfalls stimuliert um eine interne Positivkontrolle zu haben.

Die Chemokine CCL5 (RANTES), CCL4 (MIP-1 β), CCL3 (MIP-1 α), CXCL9 (MIG), IFN- γ , GM-CSF, IL-17, IL-13, TNF- α und TNF- β wurden in Anwesenheit von IL-2 bereits vermehrt von NK-Zellen produziert, ohne dass eine zusätzliche Rezeptorstimulation stattfindet. Werden NK-Zellen, ohne die gleichzeitige Stimulation mit IL-2, mit einem Antikörper gegen CD6 stimuliert kommt es zu einer Ausschüttung der Chemokine CXCL12 (SDF-1 α), CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CXCL1 (GRO- α) und der Zytokine IFN- γ , GM-CSF, IL-6, IL-17, IL-13 und TNF- α . In Anwesenheit von IL-2 werden die Chemokine/Zytokine, die nach Stimulation von CD6 freigesetzt werden sogar noch verstärkt sezerniert. Dies sind CCL4 (MIP-1 β), CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), IFN- γ , IL-6, IL-17, IL-13, TNF- α , TNF- β und TRAIL. Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von IL-2 kann durch die CD6 Rezeptorstimulation mit verschiedenen Antikörpern, bei nahezu allen hier untersuchten Analyten, beobachtet werden, dass die Aktivierung von NK-Zellen durch CD6 epitopabhängig ist.

CD16 ist ein starker aktivierender Rezeptor, über den NK-Zellen einerseits zytotoxisch wirken (Vergleich Abbildung 18) und andererseits auch Zytokine und Chemokine freisetzen können. Letztere Eigenschaft zeigt sich in diesem Experiment sehr deutlich. So sezernieren NK-Zellen, nach Stimulation ihres CD16 Rezeptors vor allem CCL5 (RANTES), CXCL9 (MIG), CCL4 (MIP-1 β), CCL3 (MIP-1 α), CXCL12 (SDF-1 α), CXCL10 (IP-10), IFN- γ , GM-CSF, IL-17, IL-13, TNF- α und TNF- β . Dabei ist die Freisetzung von CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), IFN- γ und anderen in Anwesenheit von IL-2 deutlich erhöht.

1.5.2 Kinetik der Zytokin- und Chemokinfreisetzung

Die Freisetzung von lytischen Vesikeln findet bereits innerhalb von vier Stunden statt, da das Granzym und Perforin von NK-Zellen bereits gespeichert in zytotoxischen Granula vorliegt und nicht erst auf transkriptioneller Ebene hergestellt werden muss. Im Gegensatz dazu ist für die Produktion von Zytokinen meist eine Transkription und Proteinneusynthese nötig. Die anschließende Translation und Sekretion kann von Zytokin zu Zytokin variieren. Zur Analyse der zeitlichen veränderten Zytokinausschüttung nach Rezeptorstimulation mit CD6 wurden separierte NK-Zellen eines gesunden Spenders in einer 96-Loch-Platte mit einem plattengekoppelten Antikörper gegen CD6, sowie dem Isotypen MOPC21 in Anwesenheit IL-

2 inkubiert. Nach 24 und 72 Stunden wurde die Zytokinkonzentration in den Überständen mit der Multiplex-Technologie quantifiziert.

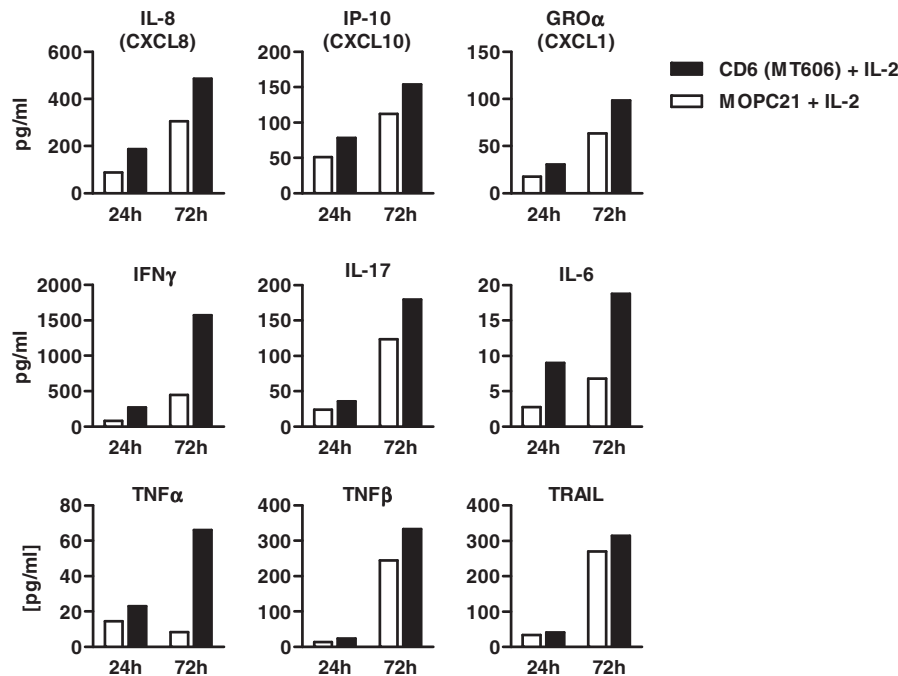


Abbildung 21: Zeitabhängige Chemokin- und Zytokinfreisetzung von separierten NK-Zellen eines gesunden Spenders nach Rezeptorstimulation.

Separierte NK-Zellen mit einer Reinheit von 99,5% (CD3-/CD56+), wurden mit 10 µg/ml plattengekoppelten Antikörpern gegen CD6 (Klon MT606, schwarze Balken) und MOPC21 (Isotypkontrolle, weiße Balken) in Anwesenheit von 500U/ml IL-2 stimuliert. Für die 24-Stunden-Werte wurden 100.000 NK-Zellen/Ansatz einer 96 Loch-Platte eingesetzt (Ø 0,32 cm²), für die 72-Stunden-Werte wurden 570.000 NK-Zellen/Ansatz in einer 24 Loch-Platte (Ø 2,00 cm²). Dabei wurde darauf geachtet, dass sowohl die Zellezahl (100.000 vs. 570.000 Zellen) als auch das Volumen des Mediums (200 µl vs. 1 ml) an die größere Fläche angepasst wurde. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde Zellkulturüberstände abgenommen und die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen mit Hilfe der Multiplex Technologie quantifiziert (pg/ml). Die Graphen sind nach Chemokinen (oben), Interleukinen (mitte) und den Mitgliedern der TNF-Superfamilie unterteilt.

In Abbildung 21 ist die Konzentration verschiedener Analyte im Zellkulturüberstand separierter NK-Zellen eines gesunden Spenders nach 24 und 72 Stunden Stimulation mit dem CD6-Antikörper (weiße Balken, Klon MT606) und MOPC21 (schwarze Balken, Isotyp) gezeigt.

Alle dargestellten Zytokine und Chemokine zeigen einen Konzentrationsanstieg mit zunehmender Dauer der Kultivierung. Dabei zeigt sich, dass bei manchen Zytokinen der Anstieg nicht allein auf die Stimulation des CD6 Rezeptors zurück zu führen ist. Betrachtet man vergleichend den jeweiligen Ansatz mit dem Isotyp-Antikörper MOPC21 ist ebenfalls ein Anstieg zu beobachten. Wie in Abbildung 21 gezeigt wurde, stimuliert IL-2 allein bereits die Freisetzung verschiedener Zytokine, die im Laufe der Zeit wiederum die Freisetzung anderer Zytokine stimulieren. Dieser Effekt zeigt sich am deutlichsten bei TRAIL. Dagegen sieht man bei IFN-γ eine deutlich erhöhte CD6 induzierte Freisetzung nach 72 Stunden.

Nach Stimulation des CD6 Rezeptors auf NK-Zellen kommt es zu einer starken Freisetzung von Zytokine, wie IFN- γ und Chemokinen, wie CXCL12 (SDF-1 α) oder CXCL8 (IL-8). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von IL-2 wird diese Freisetzung deutlich verstärkt (CCL4, CXCL12, CXCL8, CXCL10 oder CXCL1). Des Weiteren konnte neben einer zeitlichen Abhängigkeit der Zytokin- und Chemokinfreisetzung (IFN- γ , CXCL8 oder IL-6) ebenso eine epitopabhängige Freisetzung (CXCL8, CXCL1 oder CXCL12) gezeigt werden.

1.6 Intrazelluläre Chemokinproduktion von NK-Zellen und T-Zellen

Um die Fähigkeit der unmittelbaren Zytokinfreisetzung durch die Stimulation von CD6 zu untersuchen, wurde die Freisetzung der Zytokine IFN- γ und TNF- α sowie des Chemokins CXCL10 (IP-10) in NK- und T-Zellen durch intrazelluläre Färbung nachgewiesen. Da Th17-Zellen, eine Subpopulation von CD4⁺ T-Lymphozyten, in der Lage sind, IL-17 und IL-22 zu sezernieren, wurde hier die Fähigkeit von NK-Zellen zur Produktion dieser beiden Interleukine untersucht.

1.6.1 Freisetzung von IFN- γ , TNF- α und CXCL10

Neben der IL-17 und IL-22 Produktion sollte auch die direkte IFN- γ , TNF- α und CXCL10 (IP-10) Sekretion intrazellulär nachgewiesen werden. Hierzu wurden PBMC eines gesunden Spenders entweder mit einem plattengebundenen Antikörper gegen CD6 oder mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin für vier Stunden stimuliert. Als Vergleich wurde ein Ansatz mit dem plattengebundenen Isotyp-Antikörper MOPC21 mitgeführt. Jeder dieser Ansätze wurde entweder mit oder ohne 500 U/ml IL-2 durchgeführt. Nach der Stimulation wurde die intrazelluläre Färbung wie unter D.2.5 (Seite 46) beschrieben durchgeführt.

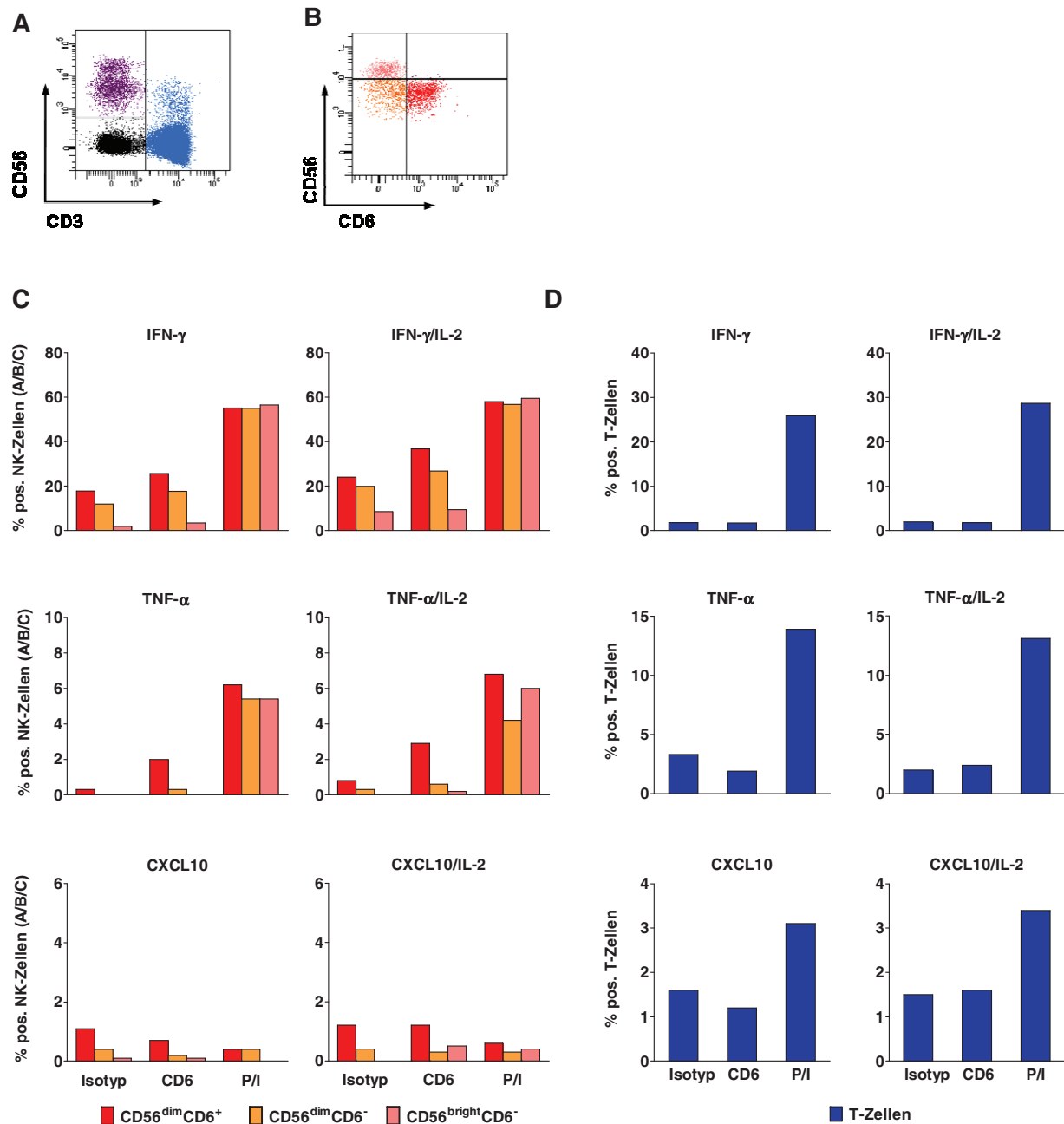


Abbildung 22: Intrazelluläre Färbung von IFN- γ , TNF- α und CXCL10 in NK-Zellen gemäß ihrer CD56/CD6 Verteilung und T-Zellen eines gesunden Spenders nach Rezeptorstimulation in An und Abwesenheit von IL-2.

PBMC eines gesunden Spenders wurden entweder mit 10 μ g/ml plattengekoppelten Antikörpern gegen den Isotyp (MOPC21) oder CD6 (MT606) stimuliert oder mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin (P/I). Pro Ansatz wurden 2×10^6 PBMC, mit oder ohne 500 U/ml IL-2 im Medium, eingesetzt. Nach einer Stunde wurde 20 μ M Monensin zugeben und weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die stimulierten Zellen mit CD56 und CD3 Antikörpern gefärbt, sowie mit Antikörpern gegen die intrazellulären Zytokine IFN- γ , TNF- α und CXCL10 (IP-10). A) Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrische Färbung von PBMC eines gesunden Spenders. Nach der Auswahl der PBMC über ihre Größe und Granularität wurden die NK- und T-Zellen über ihrer CD56/CD3 Färbung definiert (NK-Zellen=lila=CD56⁺/CD3⁻ und T-Zellen=blau=CD3⁺/CD56⁻). B) Die NK-Zellen sind zusätzlich in die drei Subpopulationen CD56^{dim}CD6⁺, CD56^{dim}CD6⁻ und CD56^{bright}CD6⁻ unterteilt worden. C) Dargestellt sind die Zytokin-positiven Zellen der jeweiligen NK-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit dem Isotyp, CD6 und P/I in An- (links) und Abwesenheit von IL-2 (rechts). D) Die gleiche Darstellungsweise ebenso für T-Zellen. Angegeben sind die Prozente der positiven Zellen aus einer von drei repräsentativen Färbungen.

In Abbildung 22/A ist die Auswertestrategie für die NK-Zellen dargestellt. Dazu wurden die Lymphozyten zunächst nach ihrer Größe und Granularität ausgewählt und anschließend die NK- ($CD56^+/CD3^-$) und T-Zellen ($CD3^+/CD56^-$) über ihrer $CD56/CD3$ Färbung definiert. Die NK-Zellen wurden, im Gegensatz zu den T-Zellen, nochmals gemäß ihrer $CD6$ Expression in drei Subpopulationen $CD56^{dim}CD6^+$, $CD56^{dim}CD6^-$ und $CD56^{bright}CD6^-$ unterteilt (Abbildung 22/A). Dieser zusätzliche Schritt soll die Unterschiede der Zytokinfreisetzung bei $CD6$ positiven und negativen NK-Zellen zeigen. Im letzten Schritt wurde die Expression von $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ und $CXCL10$ (IP-10) auf T-Zellen (Abbildung 22/C, blau) und den drei verschiedenen NK-Zell-Subpopulationen (Abbildung 22/B) getrennt voneinander ermittelt und die positiven Zellen (%) in einem Balkendiagramm dargestellt.

Nach 6 Stunden ohne IL-2 produzieren nur die $CD56^{dim}$ NK-Zellen $IFN-\gamma$, wobei es innerhalb dieser Gruppe vor allem die $CD6^+CD56^{dim}$ Subpopulation ist (Abbildung 22/C), die dieses Zytokin spontan produziert. Nach der Stimulation mit einem $CD6$ -Antikörper zeigt sich eine Zunahme der Zytokinproduktion in allen drei Fraktionen, vorwiegend aber in der $CD6^+$ Fraktion, die durch IL-2 nochmals verstärkt wird. Die unspezifische Stimulation mit PMA und Ionomycin löst dagegen einen Anstieg der $IFN-\gamma$ produzierenden NK-Zellen in allen drei Populationen aus, der IL-2 unabhängig ist. Im Vergleich dazu konnten, selbst bei der Stimulation mit PMA und Ionomycin, nur geringe Mengen an $TNF-\alpha$ produzierenden NK-Zellen detektiert werden. Dennoch führt die Stimulation von $CD6$ (MT606) in den $CD56^{dim}CD6^+$ NK-Zellen zu einem Anstieg der $TNF-\alpha$ Expression. Im Vergleich zu $IFN-\gamma$ fällt hier der verstärkende IL-2-Effekt geringer aus. Im Gegensatz zu $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ produzieren weniger als 1,5% der NK-Zellen $CXCL10$ (IP-10), selbst nach Stimulation mit PMA/Ionomycin, was dadurch erklärt werden kann, dass dieses Chemokin $IFN-\gamma$ abhängig produziert wird.

Innerhalb der T-Zellen kam es bei keinem der untersuchten Zytokine zu einer Zytokinproduktion, nach $CD6$ -Stimulation, obwohl es in Anwesenheit von PMA/Ionomycin zu einem Anstieg von $INF-\gamma$, $TNF-\alpha$ - und sogar $CXCL10$ -positiven T-Zellen kommt. Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin ist kein Unterschied zwischen der An- oder Abwesenheit von IL-2 zu beobachten, was bedeutet, dass auf T-Zellen weder $CD6$ allein, noch in Kooperation mit IL-2 zu einer Zytokinfreisetzung führt.

1.6.2 Die Freisetzung von IL-17 und IL-22 in NK- und T-Zellen

Erst in den letzten Jahren wurde eine $CD4^+$ T-Lymphozytenpopulation beschrieben, die in der Lage ist, IL-17 und IL-22 zu sezernieren und daher Th17 genannt wird [100]. Wie in den vorhergehenden Versuchen gezeigt wurde, können NK-Zellen, ebenso wie T-Zellen, IL-17 sezernieren (Abbildung 20, Seite 74). Da die Zytokinfreisetzung im Unterschied erst nach 24-

72 Stunden analysiert wurde, sollte im Folgenden die direkte, rezeptorunabhängige Freisetzung von IL-17, IL-22 und für NK-Zellen, zusätzlich die IFN- γ Sekretion untersucht werden. Dazu wurden NK-Zellen aus PBMC eines gesunden Spenders, mit einer Reinheit von 99,9%, isoliert und mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin für vier Stunden stimuliert. Ein weiterer Ansatz ohne PMA/Ionomycin wurde mitgeführt, um die spontane IL-17 und IL-22 Freisetzung bestimmen zu können. Zum Nachweis der IL-17 und IL-22 Sekretion in T-Zellen wurden PBMC eines anderen gesunden Spenders ebenfalls vier Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert. Anschließend erfolgte der IL-17, IL22 und IFN- γ Nachweis der stimulierten und unstimulierten Zellen durch eine intrazelluläre Färbung (siehe Methoden D.2.5, Seite 46).

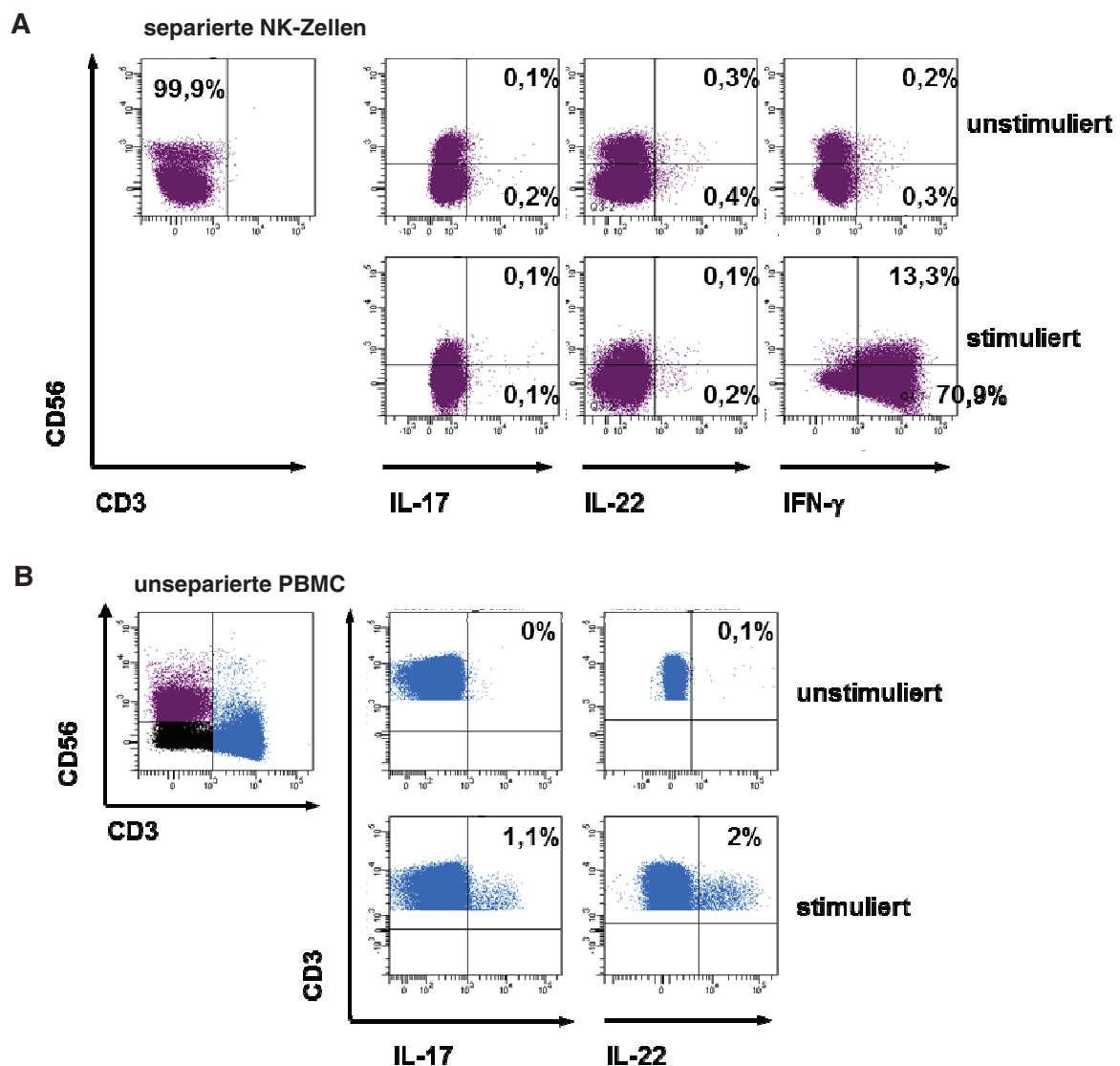


Abbildung 23: Intrazelluläre Färbung von IL-17, IL-22 und IFN- γ in NK und T-Zellen eines gesunden Spenders nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.

(A) Separierte NK-Zellen (lila) mit einer Reinheit von 99,9% wurden mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin in TM bei 37°C inkubiert (stimuliert). Nach einer Stunde wurde zu jedem Ansatz 20 µM Monensin gegeben und für weitere 3h inkubiert. Um die spontane Interleukin-Produktion zu erfassen, wurde ein Ansatz mit Medium ohne PMA/Ionomycin mitgeführt (unstimuliert). Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die Oberflächenrezeptoren CD56 und CD3 und gegen intrazelluläres IL-17, IL-22 und IFN-γ gefärbt. (B) Unseparierte PBMC eines andern gesunden Spenders wurde wie in A beschrieben behandelt. Angegeben sind die Prozente der positiven Zellen/Quadrant einer von drei repräsentativen Färbungen.

Abbildung 23 zeigt exemplarisch eine von drei durchflusszytometrischen Analysen von NK-Zellen (A, lila) und T-Zellen (B, blau). Die jeweils obere Reihe zeigt die Färbung der intrazellulären Interleukine (und IFN-γ bei NK-Zellen) in den unstimulierten Zellen und die untere die Färbung der stimulierten Zellen.

Der Vergleich von unstimulierten und stimulierten NK-Zellen zeigt, dass unter den gewählten Bedingungen bei einem gesunden Spender kein IL-17 oder IL-22 intrazellulär nachgewiesen werden kann. Gleichzeitig zeigt die Färbung von IFN-γ, dass die Anzahl der positiven NK-Zellen von insgesamt 0,5% (unstimuliert) auf 84,2% (stimuliert) ansteigt, wobei hier sowohl die CD56^{dim} als auch die CD56^{bright} NK-Zellen IFN-γ produzieren. Ein Grund, warum unter diesen Bedingungen keine IL-17 oder IL-22 positiven NK-Zellen detektiert wurden, könnte in der für die direkte Freisetzung zu kurzen Stimulationszeit (vier Stunden) liegen. Wie in Abbildung 21 gezeigt, steigt die IL-17 Freisetzung erst nach mehreren Tagen an. Zudem ist die Quantifizierung mit der Multiplex-Analyse wesentlich sensitiver als die Methode der intrazellulären Färbung auf Einzelzellniveau. Da aber eine längere Behandlung mit PMA/Ionomycin toxisch für die Zellen ist, wäre diese Art der Stimulation nicht geeignet für den Nachweis von IL-17 und IL-22 in NK-Zellen von gesunden Spendern.

Anders als bei NK-Zellen kann in T-Zellen eine, wenngleich geringe, IL-17 und IL-22 Freisetzung detektiert werden. Unstimulierte T-Zellen exprimieren kein IL-17, welches jedoch durch Behandlung mit PMA/Ionomycin auf einer Subpopulation von 1,1% induziert wird. IL-22 wird von 0,1% der unstimulierten T-Zellen exprimiert, wohingegen nach Stimulation ein Anstieg auf 2% zu sehen ist, was immer noch eine geringe Frequenz IL-22 produzierender T-Zellen bedeutet.

Nach Stimulation des CD6 Rezeptors zeigt sich ein Anstieg der IFN-γ produzierenden Zellen, vorwiegend in der CD56^{dim}CD6⁺ Subpopulation. Dieser Effekt kann durch IL-2-Rezeptorsignale verstärkt werden. Obwohl nur wenige NK-Zellen TNF-α exprimieren, sind dies ebenfalls ausschließlich CD56^{dim}CD6⁺ NK-Zellen. CXCL10 wurde dagegen spontan, auch nach PMA/Ionomycin Stimulation, kaum von NK-Zellen exprimiert, was die Abhängigkeit von einem vorhergehenden IFN-γ-Stimulus unterstreicht.

Bei T-Lymphozyten konnte nach CD6 Stimulation kein Anstieg der IFN- γ , TNF- α oder CXCL10 positiven Zellen beobachtet werden, wodurch bestätigt wurde, dass CD6 auf T-Zellen keine Zytokinfreisetzung induziert.

2 NK- und T-Zellen im Kontext autoimmuner und nicht-autoimmuner Gelenkerkrankungen

Im zweiten Teil der Arbeit wurden NK- und T-Zellen im Kontext von Gelenkerkrankungen untersucht. Der Focus hierbei lag auf dem Vergleich der autoimmunen Gelenkerkrankung rheumatoide Arthritis (RA) mit der nicht autoimmunen Gelenkerkrankung Arthrose. Die rheumatoide Arthritis zählt zu den entzündlichen Erkrankungen, bei der Gelenke und verschiedene andere gelenkassoziierte Gewebe vom eigenen Immunsystem (autoimmun) angegriffen werden. In Tabelle 2 und 3 (Seite 34) sind die Informationen über das Patientenkollektiv, auf das in dieser Arbeit zurückgegriffen wurde, zusammengefasst. Unter den rheumatoiden Arthritiden sind zwei Patienten mit reaktiver Arthritis, acht Patienten mit (undifferenzierter) Oligo- (2-5 Gelenke befallen) und Polyarthritis (mehr als 5 Gelenke befallen), elf Patienten mit unbekannter Differentialdiagnose und 15 Patienten mit der Diagnose klassische rheumatoide Arthritis. Diese Eingruppierung erfolgte durch die Kooperationspartner (C.8, Seite 39). Um den Unterschied zwischen dem autoimmunen und dem nicht-autoimmunen Krankheitsbild definieren zu können, wurden parallel Proben von Patienten mit Arthrose untersucht. Bei Arthrosen handelt es sich um eine degenerative Gelenkerkrankung (zunächst der Knorpel, später auch Knochen), bei der die Ursachen in der Überbelastung (Übergewicht, Leistungssport, Fehlstellungen) und einem damit einhergehenden Gelenkverschleiß liegt. Grundsätzlich können hierbei alle Gelenke betroffen sein. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch ausschließlich Proben von Patienten mit Kniegelenksarthrosen (Gonarthrosen) untersucht, wobei die Lymphozytenpopulationen und das Mikromilieu im Vordergrund standen. Die Synovialflüssigkeit (SF) der Patienten mit Arthrose enthielt generell wesentlich weniger lymphozytäres Infiltrat als die SF der Patienten mit rheumatoider Arthritis, weshalb nicht alle Leukozyten-Subpopulationen untersucht werden konnten. Aus diesem Grund stand von diesen Proben ebenfalls nur wenig Zellmaterial für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung. Als weiteres Kontrollkollektiv wurden Blutproben von gesunden Spendern untersucht, von denen jedoch aus medizinischen Gründen keine SF vorlag. Für die phänotypische Untersuchung der infiltrierenden NK- und T-Zellen wurden die mononukleären Zellen (SFMC, engl.: *synovial fluid mononuclear cells*) wie unter D.1.4 (Seite 41) beschrieben aus der Kniegelenk-Synovialflüssigkeit der Arthrose- und Arthritis-Patienten isoliert. Unter D.1.3 (Seite 41) ist die Isolierung der peripheren PBMC beschrieben.

2.1 Phänotyp von NK- und T-Zellen in der Peripherie und Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose

Unter Punkt E.1.1 und E.1.2 (Seite 54 und 56) wurden neben der Expression der Oberflächenmarker CD6 und CD16 auch andere Oberflächenmarker auf peripheren NK- und T-Zellen eines gesunden Spenders beschrieben. Im Folgenden wurde die Expression dieser Marker auf NK- und T-Zellen von Patienten mit Arthrose oder Arthritis aus der Peripherie (PBMC) und aus der Synovialflüssigkeit (SFMC) untersucht.

2.1.1 CD6 und CD16 Expression auf peripheren und synovialen NK- und T-Zellen von Patienten mit Arthritis und Arthrose

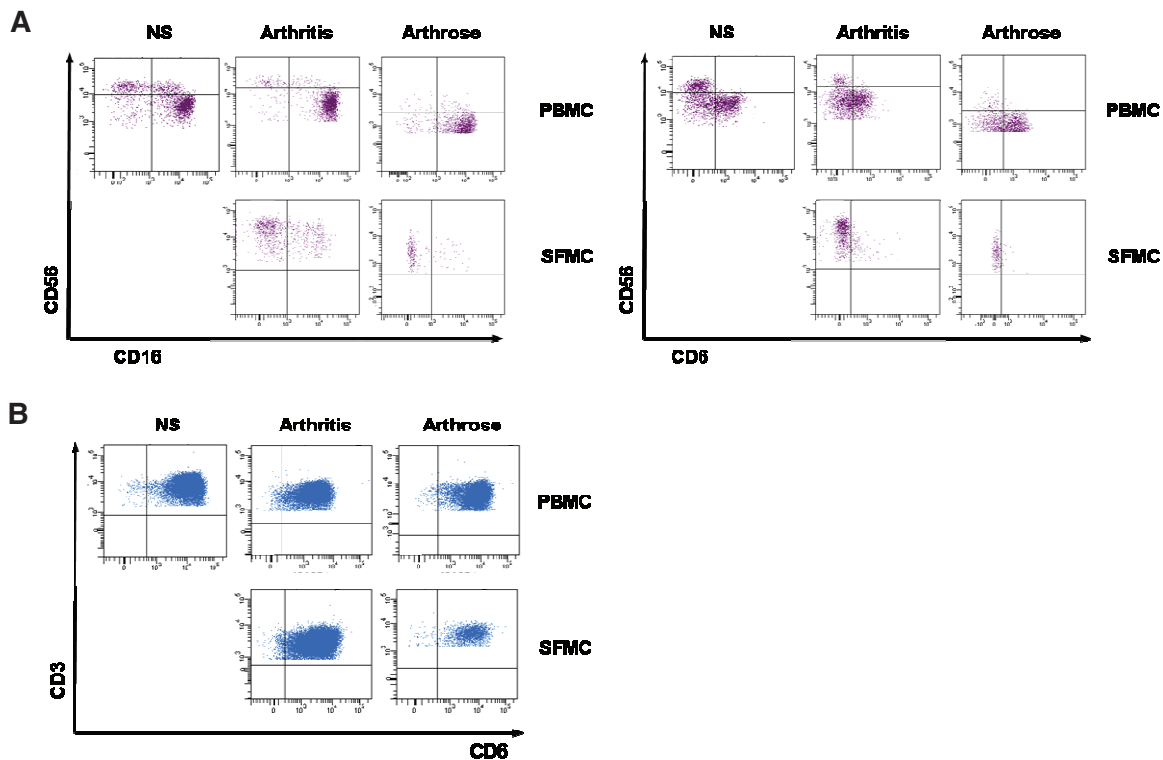


Abbildung 24: CD6 und CD16 Expression auf humanen NK- und T-Zellen aus SFMC und PBMC von Patienten mit Arthrose und rheumatoider Arthritis.

Exemplarisch dargestellt ist eine durchflusszytometrische Färbung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und mononukleäre Zellen aus der Synovialflüssigkeit (SFMC) von Patienten mit rheumatoiden Arthritiden und Arthrose sowie PBMC eines gesunden Spenders (NS) (A und B). Die getrennte Darstellung der NK- und T-Zellen erfolgte nach der in Abbildung 12 beschriebenen Gating-Strategie mittels der eine Subgruppierung der NK-Zellen (A, lila) anhand ihrer CD6 und CD16 und bei T-Zellen (B, blau) anhand ihrer CD6 Expression möglich war.

In Abbildung 24 ist exemplarisch eine durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von CD6 auf NK- (Abbildung 24/A) und T-Zellen (Abbildung 24/B) aus SFMC und PBMC eines Patienten mit Arthritis und eines Patienten mit Arthrose im Vergleich zu NK- und T-Zellen aus PBMC eines gesunden Spenders gezeigt. Für NK-Zellen ist zusätzlich die

Expression von CD16 dargestellt (Abbildung 24/A), auf die für T-Zellen verzichtet wurde, da diese kaum CD16 exprimieren.

Im Blut (PBMC) der Arthritis und Arthrose-Patienten liegen CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen in der gleichen Verteilung wie in den Normalspendern vor, unabhängig davon, ob es sich um autoimmune oder nicht-autoimmune Erkrankungen handelt. Hingegen dominiert in der Synovialflüssigkeit des hier betrachteten Patientenkollektivs die CD56^{bright} Subpopulation, wie sie in der Literatur bereits beschrieben [101, 102] wurde. Die Anreicherung der CD56^{bright} Zellen ist dabei unabhängig davon, ob ein autoimmunes oder nicht-autoimmunes Krankheitsbild vorliegt. Da CD56 nach Aktivierung verstärkt von NK-Zellen exprimiert wird, ist eine Unterscheidung der beiden Subpopulationen allein anhand dieses Markers problematisch. Da hier aber die selektive Infiltration der CD56^{bright} NK-Zellen weiter untersucht werden sollte, wurden zusätzlich die Oberflächenmarker CD16 und CD6 betrachtet. Wie bereits in Abbildung 12 gezeigt, werden diese Rezeptoren hauptsächlich von den CD56^{dim} NK-Zellen exprimiert. Die infiltrierenden NK-Zellen wurden daher weiter über die Abwesenheit von CD6 und CD16 untersucht. Exemplarisch ist in Abbildung 24 bereits deutlich zu sehen, dass auf SFMC-NK-Zellen das CD6 Molekül fehlt, unabhängig von der residualen CD16 Expression. Dies wird durch die statistischen Analysen der Arthritis- und Arthrose-Patienten weiter unterstrichen (Abbildung 25).

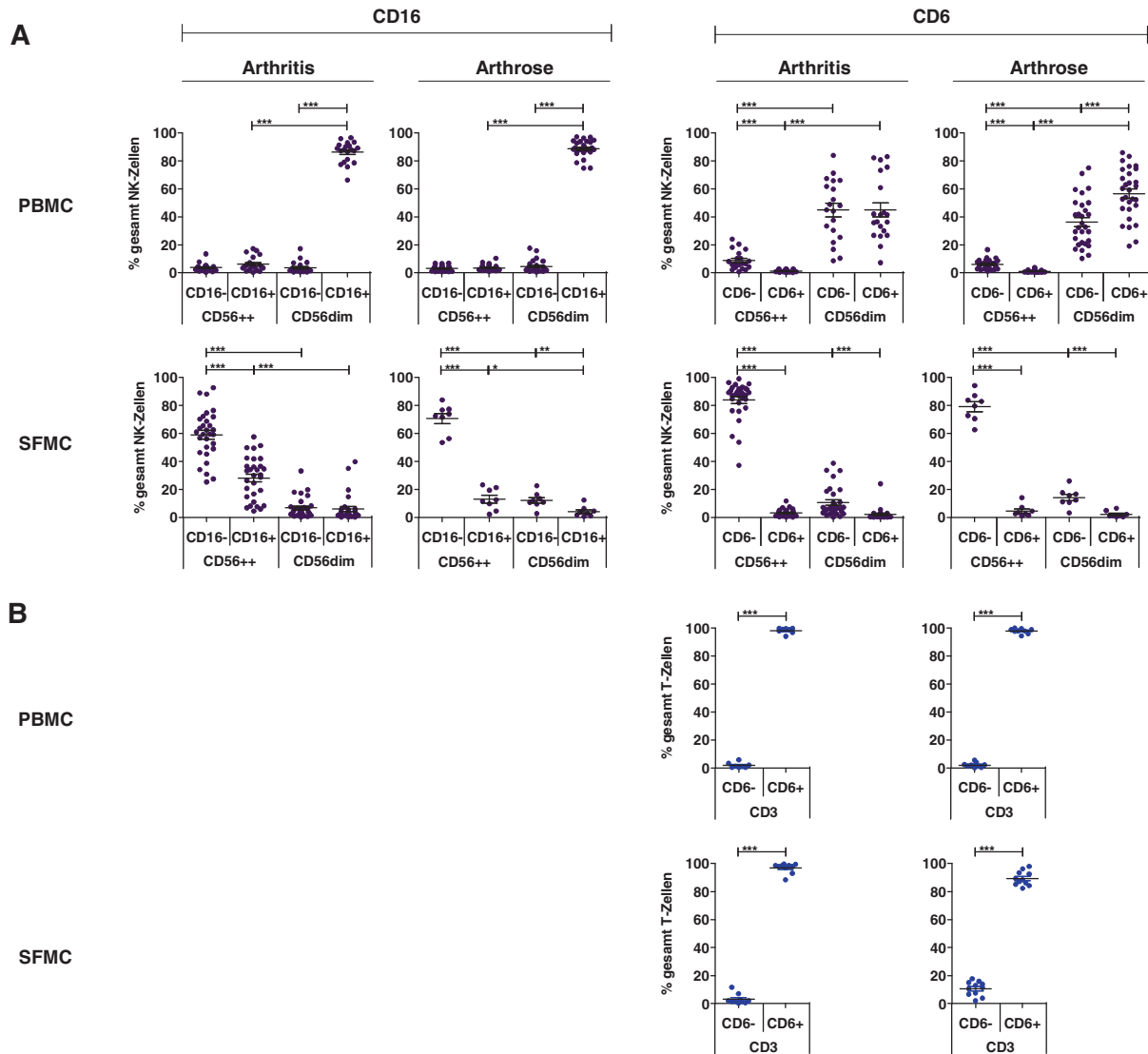


Abbildung 25: Statistische Analyse der CD6 und CD16 Expression auf humanen NK- und T-Zellen aus SFMC und PBMC von Patienten mit Arthrose und rheumatoider Arthritis.

Durchflusszytometrische Färbung von PBMC und SFMC aus Arthritis- und Arthrose-Patienten mit Antikörpern gegen CD56, CD6 und CD3. Für die Auswertung wurden die Lymphozyten nach Größe und Granularität definiert und die CD6 und CD16-Expression auf den CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen (A, lila) und den CD56⁺CD3⁺ T-Zellen (B, blau) untersucht. Die NK-Zellen sind unterteilt in ihre Subpopulationen CD56^{bright} und CD56^{dim}. Dargestellt ist der prozentuale Anteil bezogen auf die gesamte NK-Zellanzahl. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Spender. Der Median ist als schwarzer Balken dargestellt und als * die Signifikanzen (***) < 0,0001, ** 0,0047, * 0,011). Periphere NK-Zellen Arthritis-Patienten: n=20, Periphere NK-Zellen Arthrose-Patienten: n=27, synoviale NK-Zellen Arthritis-Patienten: n=30, NK-Zellen Arthrose-Patienten: n=8, Periphere T-Zellen Arthritis-Patienten: n=8, Periphere T-Zellen Arthrose-Patienten: n=9, synoviale T-Zellen Arthritis-Patienten: n=10, T-Zellen Arthrose-Patienten: n=11

Abbildung 25 A zeigt die Analysen der CD6 und CD16 Expression getrennt nach CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zellen und unter B die CD6 Expression auf T-Zellen. Die peripheren NK-Zellen der Normalspender, Arthritis- und Arthrose-Patienten lassen sich hinsichtlich ihrer CD16 Expression in die beiden Subpopulationen CD56^{bright}CD16⁻ und CD56^{dim}CD16⁺ einteilen. Der Anteil an CD16⁺CD56^{dim} NK-Zellen an der Gesamt-NK-Zellpopulation liegt für Arthritis-Patienten bei 86,2±7,7% (Mittelwert±SD) und bei Arthrose-Patienten bei 88,6±6,1%. Damit zeigt sich eine Predominanz der CD16⁺CD56^{dim} NK-Zellen, ebenso wie es bereits in

Abbildung 12 für Normalspender gezeigt wurde, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten bestehen. Hingegen zeigt sich in der Synovialflüssigkeit eine signifikante Verschiebung der NK-Subpopulationen hin zu einer deutlichen Dominanz der $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ NK-Zellen. Innerhalb der Patienten mit Arthritis oder Arthrose liegt der prozentuale Anteil der $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ synovialen NK-Zellen bei $59,1 \pm 17,3\%$ bzw. $70,6 \pm 10,5\%$ ($p=0,043$). In der Synovialflüssigkeit der Arthritiden finden sich, im Gegensatz zu den Arthrosen, $CD16^+$ NK-Zellen, deren CD56 Expression erhöht ist. Dies deutet entweder darauf hin, dass die NK-Zellen aktiviert sind und CD56 verstärkt produziert wird, oder dass es in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit einem autoimmunen Krankheitsbild einen erhöhten Anteil von $CD56^{\text{bright}}$ NK-Zellen gibt, die CD16 exprimieren.

Ein weiterer Marker mit dem die PBMC und SFMC der Patienten untersucht wurden ist CD6. Bei Normalspendern exprimiert die Mehrheit der $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ NK-Zellen CD6 deutlich auf ihrer Oberfläche, wohingegen die $CD56^{\text{bright}}$ NK-Zellen $CD6^-$ sind, unabhängig von ihrer CD16 Expression (Abbildung 12, Seite 55). Zunächst fällt auf, dass im Blut (PBMC) der Arthrose-Patienten mehr $CD56^{\text{dim}}CD6^+$ NK-Zellen ($56,6 \pm 17,9\%$) vorliegen als bei den Arthritis-Patienten ($45 \pm 22,8\%$), wobei hier eine große Variabilität vorliegt. Dies führt zu einer gleichmäßigen Verteilung zwischen $CD56^{\text{dim}}CD6^+$ und $CD56^{\text{dim}}CD6^-$ NK-Zellen innerhalb der Arthrose-Patientengruppe, die sich damit signifikant von den Normalspendern unterscheidet. Betrachtet man die CD6-Expression der SF-infiltrierenden NK-Zellen, so ist in beiden Patientengruppen hochsignifikant die Abwesenheit der $CD6^+$ NK-Zellen zu erkennen (Abbildung 25/A). Damit stellen sich mit $83,9\% \pm 13,6\%$ bei den Arthritiden und $79,11\% \pm 10,1\%$ bei den Arthrosen nun die $CD56^{\text{bright}}CD6^-$ Zellen als dominierende NK-Zell-Population dar.

In Abbildung 24/B bzw. Abbildung 25/B sind die peripheren (PBMC) und infiltrierenden T-Zellen (SFMC) nach ihrer CD3 und CD6 Expression dargestellt. Vergleicht man die peripheren $CD3^+CD6^+$ T-Zellen der Normalspender (aus Abbildung 12: $99,6 \pm 0,5\%$) mit denen der Arthritis- ($98,18 \pm 1,94\%$) und Arthrose-Patienten ($97,86 \pm 1,76\%$) zeigt sich kein Unterschied. Betrachtet man dagegen die CD6 Expression der infiltrierenden T-Zellen in der Synovialflüssigkeit, so findet man hier, im Gegensatz zu den NK-Zellen, nach wie vor $CD6^+$ T-Zellen. In der Synovialflüssigkeit ist lediglich eine verminderte Anzahl der $CD3^+CD6^+$ T-Zellen gegenüber der Peripherie bei Patienten mit Arthrose zu beobachten (PBMC: $97,7 \pm 1,8\%$, SFMC: $89,4 \pm 5,1\%$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD6 auf NK-Zellen in Bezug auf die Gewebepräsenz, in diesen eine andere Funktion als auf T-Lymphozyten besitzt und somit einen spezifischen, wenngleich negativ korrelierenden NK-Zell-Infiltrationsmarker in die SF darstellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der Peripherie der Arthritis- und Arthrose-Patienten die gleiche Verteilung der NK-Zell-Subpopulationen wie bei Normalspendern vorliegt (Median ~90% CD56^{dim} zu ~10% CD56^{bright}). Dieses Verhältnis ist mit einer Dominanz der CD56^{bright} NK-Zellpopulation in den Synovialflüssigkeiten, unabhängig davon ob ein autoimmunes und nicht-autoimmunes Krankheitsbild vorliegt, invertiert und damit hoch signifikant verändert. Eine vertiefende Analyse der CD56^{dim} und CD56^{bright} Populationen mit Hilfe der CD6 Expression zeigt, dass dieser Marker die synovialen NK-Zellen zuverlässiger charakterisieren kann als CD56 und CD16, oder einer der anderen >20 untersuchten Marker (nicht gezeigt). Denn obwohl sich noch CD16⁺ NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit befinden, exprimieren diese kein CD6 und r presentieren damit die CD6⁻CD56^{dim}-Fraktion.

Bei den untersuchten T-Zellen aus der Peripherie der Patienten zeigt sich ebenfalls keine Veränderung in der Anzahl der CD3⁺CD6⁺ Zellen. Dagegen zeigt sich in den analogen Synovialflüssigkeiten beider Patientengruppen, eine verminderte Anzahl an CD3⁺CD6⁺ T-Zellen (nicht signifikant). Die infiltrierenden T-Zellen in der Synovialflüssigkeit exprimieren demnach CD6 in unveränderter Menge, was auf eine unterschiedliche Funktion dieses Markers auf T- und NK-Zellen hindeutet.

2.1.2 Detaillierter Phänotyp der peripheren und synovialen NK- und T-Zellen von Patienten mit Arthritis und Arthrose

Um den Phänotyp der infiltrierenden NK- und T-Zellen weiter zu charakterisieren, wurde die Expression der Oberflächenmarker für die natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren NKp46, NKp30 und NKp44 sowie für die C-Typ-Lekin-Rezeptoren NKG2D, NKG2C, NKG2A und CD94 auf den SFMC und PBMC der Arthritis-Patienten analysiert. Da von Patienten mit Arthrose durch eine geringere Entzündungsreaktion sehr viel weniger Synovialflüssigkeit mit einem geringeren Anteil an lymphozytäres Infiltrat vorlag, konnte für dieses Kollektiv keine weitere phänotypische Charakterisierung vorgenommen werden.

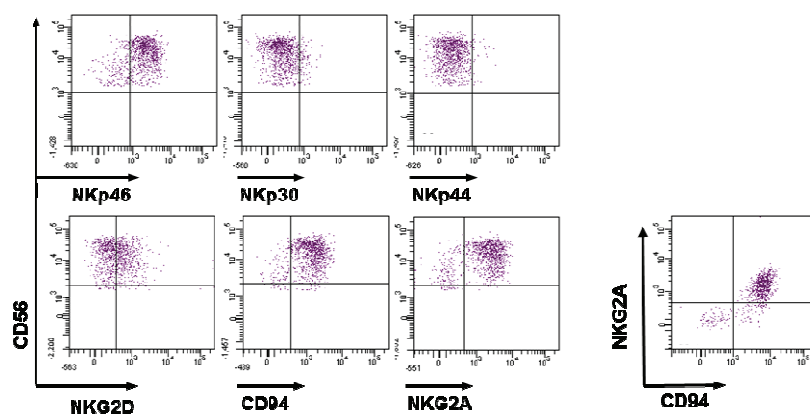
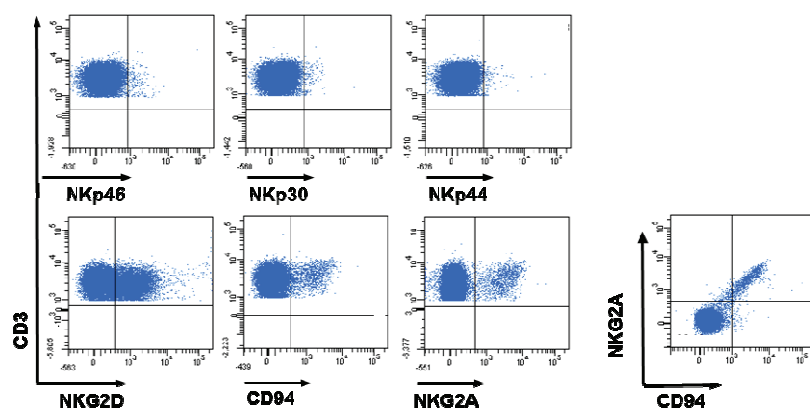
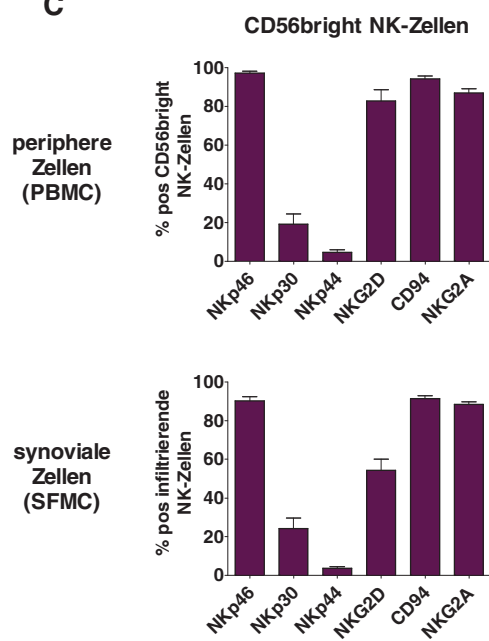
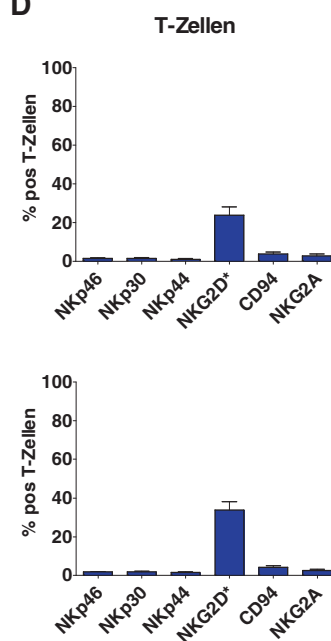
A**synoviale NK-Zellen****B****synoviale T-Zellen****C****D**

Abbildung 26: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf synovialen und peripheren NK- und T-Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis.

Gezeigt ist eine exemplarische durchflusszytometrische Färbung der natürlichen-zytotoxizitäts-Rezeptoren (natural cytotoxicity receptors, NCR) NKp46, NKp30 und NKp44 sowie von NKG2D, CD94 und NKG2A auf synovialen NK-Zellen (A, lila) und T-

Zellen (B, blau) eines Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA). Die Gating-Strategie erfolgte wie in Abbildung 12 beschrieben. (C) Neben der in A und B dargestellten Oberflächenexpression der jeweiligen Rezeptoren auf SFMC ist hier zusätzlich die Verteilung der Rezeptoren auf den PBMC von Patienten mit RA aufgezeigt. Die Graphen zeigen die Auswertung des prozentualen Anteils an gesamt NK-Zellen, aufgeteilt in CD56^{dim} NK-Zellen (links) und CD56^{bright} NK-Zellen (rechts). In (D) ist der prozentuale Anteil der gesamt T-Zellen dargestellt. Ein Punkt repräsentiert einen Spender und der Mittelwert mit dem Standardfehler ist als schwarze Balken gezeigt. (periphere NK- und T-Zellen n=7, synoviale NK- und T-Zellen n=10) Die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen der Rezeptor positiven NK und T Zellen aus PBMC oder SFMC sind im Anhang in Tabelle 8 (Seite 140) zusammengestellt.

In der Peripherie der Arthritis-Patienten zeigt sich, dass die NKp46 Verteilung zwischen den CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zell-Subpopulationen zu denen in der Peripherie der Normalspender unverändert ist (Abbildung 26). So exprimieren bei den Arthritis-Patienten 59,5±22,8% der CD56^{dim} und 6,3±2,5% der CD56^{bright} NK-Zellen NKp46, und bei den Normalspendern 74,7±9,0% der CD56^{dim} und 7,6±2,1% der CD56^{bright} NK-Zellen (Abbildung 26/C). Wenngleich nicht signifikant, zeigen die CD56^{dim} NK-Zellen der Normalspender einen höheren Prozentsatz an NKp46⁺ Zellen im Vergleich zu denen der Arthritis-Patienten. Betrachtet man die NKp46 Expression der synovialen NK-Zellen, so zeigt sich logischerweise eine Anreicherung der CD56^{bright}NKp46⁺ NK-Zellen. Dasselbe Muster wie bei NKp46 kann auch für NKp30 in der Peripherie der Arthritis-Patienten, im Vergleich zu den Normalspendern, beobachtet werden, wobei NKp30 generell schwach gefärbt erscheint. Ein Anstieg der NKp30⁺ NK-Zellen in der SF der Patienten ist auch hier zu sehen, jedoch deutlich geringer. Obwohl im rheumatischen Gelenk der Patienten eine autoimmune Entzündungsreaktion stattfindet, kann sowohl in der SF als auch in der Peripherie der Patienten mit Arthritis kein Anstieg des, erst nach Aktivierung (z.B. durch IL-2) exprimierten, NK-Markers NKp44 beobachtet werden.

Die T-Zellen der Arthritis-Patienten aus der Peripherie und aus der SF exprimieren, wie auch in der Peripherie von Normalspendern, keinen der natürlichen-zytotoxizitäts-Rezeptoren. Dagegen ist der prozentuale Anteil der CD94⁺NKG2A⁺ NK-Zellen in der SF von Arthritis-Patienten im Vergleich zur Peripherie stark erhöht. Wobei 88,37±4,0% der synovialen NK-Zellen von Arthritis-Patienten NKG2A exprimieren. Dagegen sind nur 38,07±10,2% der autologen peripheren CD56^{dim} und 5,37±1,9% der CD56^{bright} NK-Zellen NKG2A⁺, was der Frequenz von Normalspendern (42,84±14,9% CD56^{dim} und 5,98±2,2% der CD56^{bright}) entspricht. Die Expression des ebenfalls mit CD94 dimerisierenden NKG2C-Rezeptors auf synovialen NK-Zellen konnte nicht untersucht werden, da zu Beginn der Arbeiten mit Patientenmaterial kein direkt markierter NKG2C-Antikörper zu Verfügung stand. Da CD94 nahezu auf allen NK-Zellen exprimiert wird kann es sein, dass die Zunahme der NKG2A⁺ NK-Zellen mit einer Abnahme der NKG2C⁺ NK-Zellen in der SF einhergeht. Im Gegensatz zu den NCR konnten CD94⁺ oder NKG2A⁺ T-Zellen in der Peripherie und in der SF detektiert werden, wenngleich diese mit <10% nicht als dominante Population angesehen werden kann. Ein weiterer wichtiger aktivierender NK-Rezeptor ist NKG2D, dem bereits eine Rolle bei der rheumatoiden Arthritis in der Literatur zugeschrieben wurde [47]. Die NKG2D⁺ NK-

Zellen nehmen in der Peripherie der Patienten mit Arthritis im Vergleich zu Normalspendern ab. So exprimieren in der Peripherie 61,4% ($55,98 \pm 28,9\%$ CD56^{dim} und $5,36 \pm 1,4\%$ CD56^{bright}) der Patienten und 87,76% ($81,65 \pm 8,57\%$ CD56^{dim} und $6,11 \pm 1,95\%$ CD56^{bright}) der Normalspender NK-Zellen NKG2D. Dagegen ist mit 54,2% die Frequenz der NKG2D⁺ NK-Zellen in der SF der Arthritis-Patienten, im Vergleich zu den autologen NK-Zellen etwas, jedoch nicht signifikant, geringer.

Betrachte man die T-Zellen, so konnte ein leichter Unterschied zwischen den synovialen ($33,69 \pm 13,8\%$) und den autologen peripheren T-Zellen ($23,8 \pm 10,5\%$) der Patienten beobachtet werden (Abbildung 26/D). Im Vergleich zum peripheren Blut, sind die CD8⁺ ZTL in den SF der Arthritis-Patienten signifikant ($p=0,0029$) erhöht, wohingegen die CD4⁺ T-Helfer-Zellen in den SF nicht signifikant reduziert sind ($p=0,4998$). Interessant ist dabei, dass die Anzahl der NKG2D⁺ T-Zellen ($33,07 \pm 6,1\%$) in der Peripherie der Normalspender denen der synovialen T-Zellen entspricht.

Vergleicht man die CD56^{bright} NK-Zellen aus der Peripherie von Arthritis-Patienten mit denen der Normalspender zeigt sich eine vergleichbare Verteilung der hier betrachteten Rezeptoren. Dagegen zeigt sich eine Zunahme der peripheren NKp46⁺ und in geringerem Ausmaß NKp30⁺ CD56^{dim} NK-Zellen der Patienten im Vergleich zu Normalspendern. Im Gegensatz dazu steht NKG2D, wobei in der Peripherie der Patienten weniger CD56^{dim}NKG2D⁺ NK-Zellen detektierbar sind als in der Peripherie von Normalspendern. Die Menge der NKG2D⁺ NK-Zellen aus der SF ist indes geringer als in peripheren NK-Zellen der Patienten, jedoch vergleichbar mit den peripheren NKG2D⁺ NK-Zellen der untersuchten Normalspender. Vergleicht man die peripheren NK-Zellen der Patienten mit deren analogen NK-Zellen aus der SF, so zeigt sich ein anderes Muster. Hier kommt es zu einem starken Anstieg der NKp46⁺, CD94⁺, NKG2A⁺ sowie in geringerem Umfang NKp30⁺ synovialen NK-Zellen. Wie in der Peripherie der Normalspender konnte auch auf den peripheren und synovialen T-Zellen der Patienten keine Expression der NCR, CD94 und NKG2A beobachtet werden. Ebenso konnte auf CD8⁺ T-Zellen NKG2D nachgewiesen werden, wobei auch hier kein Unterschied zwischen den betrachteten Kohorten zu sehen war.

2.2 Verteilung der CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zellen in der Synovialmembran von Patienten mit Arthrose

In Abschnitt E.2.1 (Seite 84) konnte gezeigt werden, dass ausschließlich CD56^{bright}CD6⁻ NK-Zellen in der SF von Arthritis- und Arthrose-Patienten zu finden sind, obwohl CD56^{dim}CD6⁺

NK-Zellen in der Peripherie der Patienten und bei Normalspendern die Hauptpopulation darstellen. Um zu untersuchen, ob $CD56^{dim}CD6^{+}$ NK-Zellen in der Synovialmembran vorhanden sind, wurden die Lymphozyten wie in Abschnitt D.1.5 (Seite 42) beschrieben, aus Gewebestücken der Synovialmembran von Arthrose-Patienten isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Das untersuchte Synovialgewebe stammt von Patienten, die eine Totalendoprothese des Knies bekommen haben, bei der dieses Gewebe teilweise entfernt wurde. Das Ersetzen des Kniegelenks durch eine Prothese wird bei Patienten mit Arthritis sehr selten durchgeführt, weshalb für dieses Patientenkollektiv keine Untersuchung der NK-Zell-Verteilung in der Membran vorgenommen werden konnte.

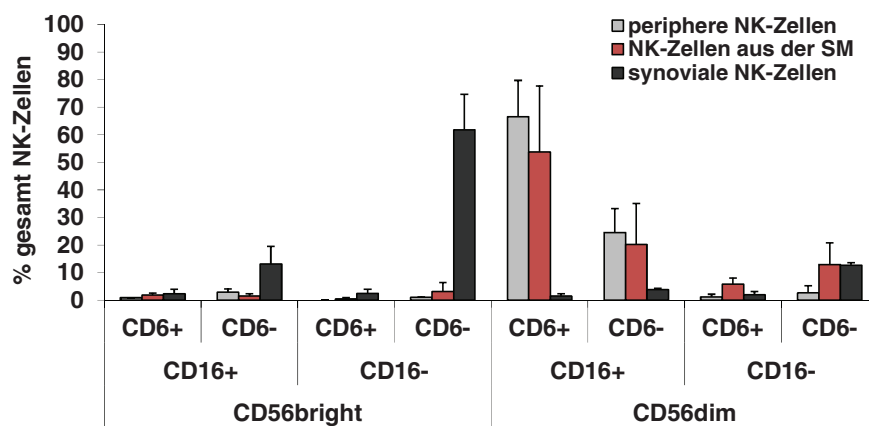


Abbildung 27: Verteilung der $CD56^{bright}$ und $CD56^{dim}$ NK-Zellen nach ihrer CD16 und CD6 Expression im Blut, in der Synovialflüssigkeit und im Gewebe von Patienten mit Arthrose.

Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Verteilung der $CD56^{bright}$ und $CD56^{dim}$ NK-Zellen gemäß ihrer CD6/CD16 Expression auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), auf der synovialen Membran (SM) und mononukleäre Zellen in der Synovialflüssigkeit (SFMC) von Patienten mit Arthrose. (n=2)

Dargestellt sind NK-Zellen nach ihrer CD6, CD16 und CD56 Expression aus dem Blut (graue Balken), der Synovialmembran (roter Balken) und der Synovialflüssigkeit (schwarzer Balken) von zwei Patienten mit Arthrose.

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, sieht man auch hier die Anreicherung der $CD56^{bright}CD16^{-}CD6^{-}$ NK-Zellen in der Synovialflüssigkeit ($61,80 \pm 12,87\%$) bei gleichzeitiger Dominanz der $CD56^{dim}CD16^{+}CD6^{+}$ NK-Zellen im Blut ($66,60 \pm 13,15\%$) der Arthritis-Patienten. Interessant ist hier, dass es kaum mehr $CD56^{bright}CD16^{-}CD6^{-}$ ($3,25 \pm 3,18\%$) NK-Zellen in der Synovialmembran, im Vergleich zur Peripherie ($53,80 \pm 23,90\%$) gibt und auch sonst die NK-Zellen aus der Synovialmembran eher dem Muster der NK-Zellen aus dem Blut entsprechen.

Es konnte gezeigt werden, dass das periphere NK-Zell-Verteilungsmuster auch in der Synovialmembran von Patienten mit Arthrose zu finden ist, obwohl die Haupt-NK-Zell-Population in der Synovialflüssigkeit die CD56^{bright}CD16⁻CD6⁻ Zellen darstellen. Diese Beobachtung ist für die Infiltration der selektiven Anreicherung der CD56^{bright}CD6⁻ NK-Zellen in der SF von Bedeutung. Die periphere Verteilung in der Synovialmembran deutet darauf hin, dass diese noch keinen Einfluss auf die NK-Zell-Verteilung ausübt. Die Umkehrung des Verhältnisses in der Synovialflüssigkeit in Richtung CD56^{bright} NK-Zellen kann daher entweder durch eine selektive Chemokin-Rekrutierung, durch die Expansion dieser NK-Zell-Subpopulation oder durch eine mögliche Differenzierung der CD56^{dim} in CD56^{bright} NK-Zellen erfolgt sein.

2.3 Rezeptorvermittelte Chemokin- und Zytokinproduktion von synovialen mononukleären Zellen

Wie in Abschnitt E.1.5 (Seite 72) beschrieben, sind NK-Zellen nach Stimulation von aktivierenden Rezeptoren in der Lage, Zytokine zu sezernieren. Da in der Synovialmembran und in der Synovialflüssigkeit (SF) von Arthritis-Patienten ein entzündliches Milieu herrscht, sollte hier untersucht werden, inwiefern NK- und T-Zellen an der Entstehung und Aufrechterhaltung dieser Umgebung beteiligt sind und welche Rezeptoren an der Ausschüttung der Chemokine/Zytokine beteiligt sind. Dazu wurden periphere Blut-Lymphozyten (PBMC) oder synoviale Lymphozyten (SFMC) eines Arthritis-Patienten, mit 100 U/ml IL-2 mit immobilisierten Antikörpern gegen CD16, NKp46, NKp30, NKG2C, NKG2D, CD3, CD6 und MOPC21 (Isotypkontrolle) stimuliert und die Überstände eines jeden Ansatzes nach 48 Stunden bezüglich der Rezeptor-vermittelten Zytokin/Chemokin Produktion (Multiplex Technologie siehe D.5.2, Seite 51) analysiert. Da synoviale NK-Zellen <1% und T-Zellen kein NKp44 exprimieren, wurde auf die Stimulation dieses Rezeptors verzichtet.

In Abbildung 28 ist die Stimulation mit dem antiCD3 Antikörper blau hervorgehoben, um die T-Zell-vermittelte Zytokinproduktion zu definieren ist. Da T-Zellen, die in die SF migrieren (SFMC), nach wie vor CD6 exprimieren, die CD56^{bright} NK-Zellen jedoch nicht (Vergleich Abbildung 24, Seite 84) kann die CD6-vermittelte Produktion damit den T-Zellen zugeschrieben werden und direkt mit dem CD3-TZR-Einfluss verglichen werden. In der Peripherie (PBMC) hingegen exprimieren sowohl die T-Zellen als auch die meisten CD56^{dim} NK-Zellen CD6 auf ihrer Oberfläche.

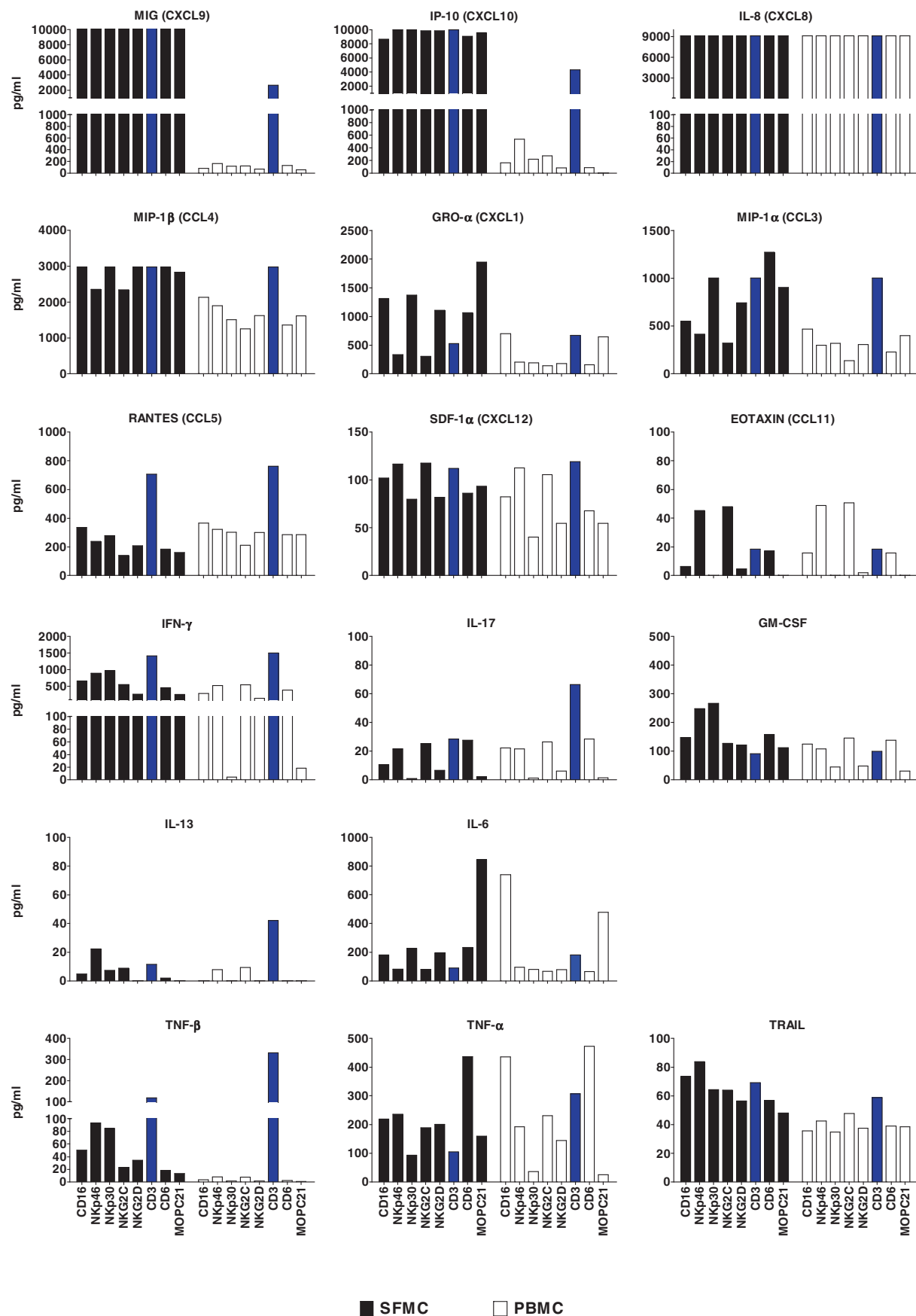


Abbildung 28: Vergleich der Chemokin- und Zytokinproduktion von PBMC und SFMC eines Arthritis-Patienten nach Stimulation verschiedener Rezeptoren.

PBMC (weiße Balken) und SFMC (schwarze Balken) eines Patienten mit rheumatoide Arthritis (RA) wurden mit 10 µg/ml plattengekoppelten Antikörpern gegen CD16, NKp46, NKp30, NKG2C, NKG2D, CD3, CD6 und MOPC21 (Isotypkontrolle) in Anwesenheit von 100 U/ml IL-2 stimuliert. Nach 48 Stunden wurde die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen im Zellkulturüberstand mit Hilfe der Multiplex Technologie quantifiziert (pg/ml). Gezeigt ist eines von drei repräsentativen Experimenten. Blau hervorgehoben sind die Werte nach Stimulation mit CD3.

Einige Chemokine wie die CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) und CXCL8 (IL-8) werden möglicherweise durch den Einfluss von IL-2, konstitutiv von den mononukleären Zellen aus der Synovialflüssigkeit (SFMC) exprimiert, dies zeigt sich, da die Konzentrationen dieser Chemokine bereits nach Stimulation mit der Isotypkontrolle (MOPC21), im Vergleich zu den PBMC, zum Teil so erhöht sind, dass sie außerhalb des messbaren Bereichs liegen. Für CXCL8 gilt dies ebenso bei den Lymphozyten aus dem Blut (PBMC) des Arthritis-Patienten, nicht aber für CXCL9 (MIG) und CXCL10 (IP-10), da diese Chemokine nicht konstitutiv, sondern hauptsächlich durch die Stimulierung des CD3-Rezeptor-Komplexes von T-Zellen freigesetzt werden. Aber auch durch Stimulation der NCR (NKp46 und NKp30) und NKG2C, welche quasi ausschließlich auf NK-Zellen exprimiert sind, wird vor allem die CXCL10 Freisetzung gefördert. Auch CCL4 (MIP-1 β) scheint von den SFMC konstitutiv sezerniert zu werden, jedoch scheint hier die Inkubation mit NKp46 und NKG2C diese Freisetzung etwas zu reduzieren. Dies kann ebenfalls bei CXCL1 (GRO- α) und CCL3 (MIP-1 α) durch weitere Rezeptoren, wie NKp30 und NKG2D beobachtet werden. Dagegen führt die Stimulation des CD6 Rezeptors auf synovialen T-Zellen zur Steigerung der konstitutiven Freisetzung von MIP-1 α , was jedoch nicht in den dazugehörigen PBMC der Fall ist. CCL5 (RANTES) wird sowohl nach CD3 Stimulation von den T-Zellen aus dem Blut als auch aus der SF vermehrt freigesetzt. Aber auch NK-Zellen aus dem Blut und der SF sezernieren nach Stimulation von CD16 und NKp30 CCL5. Die CXCL12 Freisetzung, welche ebenfalls in der SF grundsätzlich erhöht ist, wird durch CD3 Stimulation von synovialen T-Zellen und durch CD16 und NKp46 von NK-Zellen weiter angeregt. NKG2C, das mit CD94 sowohl auf NK- als auch auf T-Zellen heterodimerisiert, vermittelt ebenfalls die Freisetzung von CXCL12 in die SF. Die Stimulation der gleichen Rezeptoren und zusätzlich des CD6-Moleküls führt auch auf PBMC zur CXCL12 Produktion, wobei das CD6 Signal in PBMC den NK-Zellen zugeordnet werden kann. Im Gegensatz zu den anderen Chemokinen wird vergleichsweise wenig CCL11 (EOTAXIN) von den Lymphozyten aus der SF und dem Blut sekretiert. Vor allem NK-Zellen, aus beiden Kompartimenten, setzen dieses Chemokin nach Stimulation von NKp46 und NKG2C frei. Damit können dem aktivierenden Rezeptor bzw. Rezeptor-Komplex NKp46 bzw. NKG2C/CD94 eine wichtige Rolle in der Chemokinproduktion in SF und Blut zugeschrieben werden. IFN- γ , ein Leitzytokin der Th1-Immunantwort in der rheumatoiden Arthritis, wird von den SFMC, vor allem aber von den T-Zellen über CD3, in deutlich höherem Maß freigesetzt als von den PBMC. Dagegen führt die Rezeptorstimulation der PBMC über CD16, NKp46, NKG2C, NKG2D und CD6 zu einem stärkeren Anstieg der IFN- γ -Freisetzung, welche nahezu

an die freigesetzte Menge der SMFC heranreicht. Daher kann postuliert werden, dass diese Rezeptoren an der konstitutiven IFN- γ -Produktion in die SF beteiligt sind. Ein fast identisches Szenario ist für IL-17 zu beobachten, da hier sowohl in PBMC als auch in SFMC über CD16, NKp46, NKG2C und CD6 die Sekretion dieses Leitzytokins induziert wird. Die Stimulation der peripheren T-Zellen, über CD3 führt erstaunlicherweise zu einer verstärkten IL-17-Freisetzung als es bei den synovialen T-Zellen der Fall ist. Die Sezernierung von GM-CSF wird ebenso von CD6, NKp46 und CD16 sowohl durch synoviale als auch durch periphere Lymphozyten vermittelt. Interessanterweise ist NKp30 in der Lage die synovialen und NKG2C die peripheren NK-Zellen zur GM-CSF Produktion anzuregen. TNF- β wird dagegen hauptsächlich von den SFMC, nach Stimulation der Rezeptoren CD16, NKp46, NKp30 und CD3 sekretiert. Im Blut scheinen indes nur T-Zellen in der Lage zu sein, nach Stimulation des TZR/CD3-Komplexs, TNF- β auszuschütten. Bei TNF- α ist dagegen interessant, dass die CD3-Stimulation der synovialen T-Zellen, im Gegensatz zu den peripheren-T-Zellen, nicht zur TNF-Produktion führt. Dagegen ist die CD6 vermittelte TNF-Produktion höher als nach der Stimulation der CD16- und NC-Rezeptoren, was darauf hindeutet, dass synoviale T-Zellen eine CD6-Stimulationskapazität besitzen, die auch in der Peripherie vorhanden sein könnte. In Bezug auf TRAIL, einem Effektormolekül der Todes-Rezeptor-Familie, fällt auf, dass es in der SF konstitutiv sezerniert wird und die Produktion durch CD16- und NCR- so wie durch CD3-Rezeptor-Stimulation gesteigert werden kann. Möglicherweise ist dies ein Hinweis darauf, dass TRAIL an der rheumatischen Gewebszerstörung beteiligt ist. Im Gegensatz zu diesen Zytokinen und Chemokinen steht die Beobachtung, dass die konstitutive Sekretion von IL-6 in der SF durch nahezu alle Rezeptoren reduziert werden kann, was möglicherweise durch die Elimination von Monozyten zu erklären wäre, die durch eine Interaktion der Antikörper, auf die Fc-Rezeptoren der NK-Zellen (ADCC) zu erklären ist.

Zusammenfassen zeigt sich hier, dass vor allem T-Zellen, durch Anregung des TZR/CD3-Komplexes, in der Lage sind, Zytokine und Chemokine freizusetzen. NK-Zellen setzen aber ebenfalls Zytokine wie IL-17, TNF- β/α und Chemokine wie CXCL1, CCL3 oder CXCL12 frei, besonders über die Stimulation von NKp46, NKG2C und CD16. Die Anregung des CD6 Rezeptors führt in peripheren NK- und T-Zellen zur Freisetzung der Chemokine CXCL9, CXCL10, CXCL12 und CCL11 und der Zytokine IFN- γ , GM-CSF, IL-17, vor allem aber TNF- α . Das Apoptose-induzierende Zytokin TRAIL wird von SFMC nach Stimulation aller hier untersuchten Rezeptoren freigesetzt, wohingegen es die Zellen in der Peripherie nur nach Stimulation von CD3, NKp46 und NKG2C freisetzen. In der Synovialflüssigkeit jedoch sind es allein die T-Zellen, die Zytokine wie MIP-1 α oder TNF- α über CD6 sezernieren können. Außerdem zeigt sich

hier, dass die Stimulation verschiedener Rezeptoren der NK- und T-Zellen, je nachdem in welchem Kompartiment sich diese befinden, zu einem veränderten Zytokin, und Chemokinfreisetzungsmuster führen. Damit kann postuliert werden, dass neben T-Zellen auch NK-Zellen durch die Stimulation ihre Rezeptoren entscheidend an dem entzündeten Milieu der rheumatischen SF beteiligt sind.

2.4 IL-17 und IL-22 Produktion von synovialen mononukleären Zellen

In NK-Zellen gesunder Spender konnte vier Stunden nach Stimulation mit PMA und Ionomycin, bei gleichzeitiger Expression von IFN- γ , kein IL-17 oder IL-22 mit Hilfe der intrazellulären Färbemethode nachgewiesen werden (siehe Abschnitt E.1.6.2, Abbildung 23, Seite 80). Dagegen konnte die Freisetzung dieser Zytokine bei T-Zellen gezeigt werden. Da in der Synovialflüssigkeit der Arthritis-Patienten eine inflammatorische Situation vorliegt, lag es nahe die Expression der Zytokine ebenfalls zu untersuchen. Dazu wurden synoviale mononukleäre Zellen (SFMC) eines Patienten mit Arthritis wie unter D.1.4 (Seite 41) beschrieben isoliert, vier Stunden mit PMA und Ionomycin behandelt und anschließend IL-17 und IL-22 intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch dargestellt (siehe Methoden D.2.5, Seite 46).

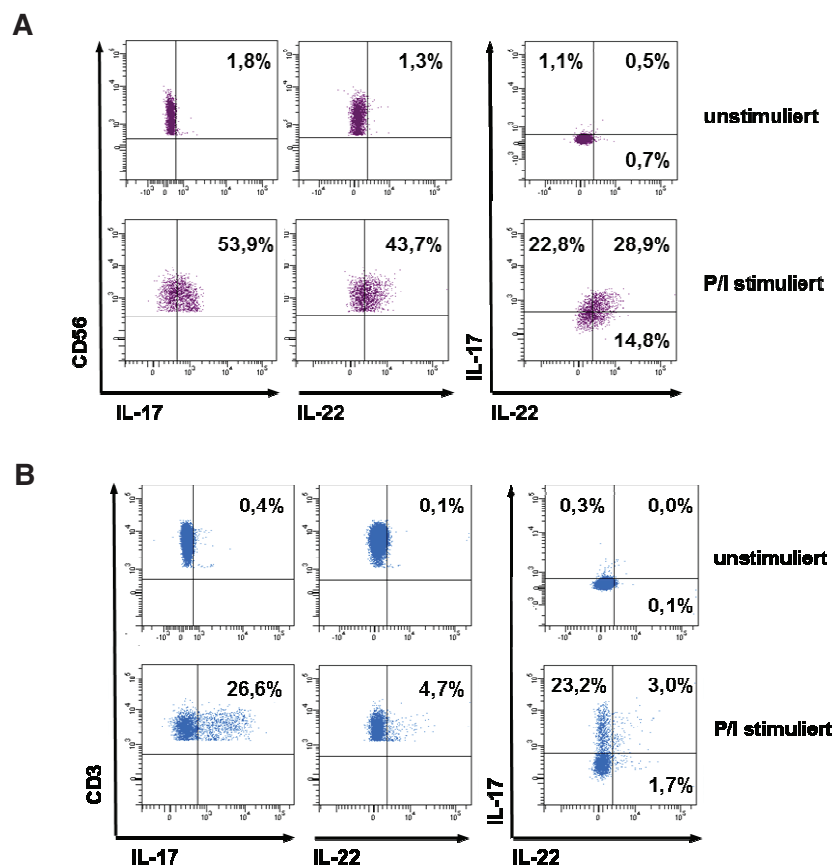


Abbildung 29: Intrazelluläre Färbung von IL-17 und IL-22 in synovialen NK- und T-Zellen eines Patienten mit Arthritis nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.

Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von NK-Zellen (lila) und T-Zellen (blau) aus synovialen mononukleären Zellen (SFMC) eines Patienten mit Arthritis. 12×10^6 SFMC wurden mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin (P/I stimuliert) in Medium inkubiert bei 37°C. Nach einer Stunde wurde zu jedem Ansatz 20 µM Monensin zugeben und für zwei weitere Stunden inkubiert. Um die spontane Interleukin-Produktion zu erfassen wurde ein Ansatz mit Medium ohne PMA/Ionomycin mitgeführt (unstimuliert). Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die Oberflächenrezeptoren CD56 und CD3 und gegen intrazelluläres IL-17 und IL-22 gefärbt. Nach der Definition der synovialen Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität wurden NK- (A, lila) und T-Zellen (B, blau) anhand ihrer CD56/CD3 Färbung separat dargestellt. Angegeben sind die Prozente der positiven Zellen/Quadrant.

Abbildung 29 zeigt eine durchflusszytometrische Analyse fokussiert auf NK- (A, lila) und T-Zellen (B, blau) aus synovialen mononukleären Zellen des Knies eines Arthritis-Patienten. Um einen Anstieg der IL-17 und/oder IL-22 produzierenden NK- und T-Zellen durch die Behandlung mit PMA/Ionomycin zu ermitteln, wurden jeweils unbehandelte Zellen gegenübergestellt. Betrachtet man zunächst die unstimulierten NK-Zellen aus der Synovialflüssigkeit, so können hier <2% IL-17 oder IL-22 positive NK-Zellen gefunden werden. Behandelt man diese Zellen jedoch mit PMA/Ionomycin, zeigt sich nach drei Stunden ein deutlicher Anstieg an IL-17 (53,9%) und IL-22 (43,7%) positiven NK-Zellen. Interessant ist darüber hinaus, dass 29% der NK-Zellen sowohl IL-17 als auch IL-22 produzieren, im Gegensatz zu NK-Zellen die nur IL-17 (22,8%) oder IL-22 (14,8%) positiv sind. Damit unterscheiden sich synoviale NK-Zellen von synovialen T-Zellen, die ebenfalls nach der Behandlung mit PMA/Ionomycin vermehrt IL-17 oder IL-22 produzieren, nicht nur in der Menge der Interleukin produzierenden Zellen, sondern auch in der Anzahl der IL-17/IL-22 doppelt-positiven Zellen. So exprimieren 23,2% der T-Zellen deutlich mehr IL-17 als IL-22 (1,7%) aber nur 3% aller T-Zellen sind doppelt positiv für IL-17 und IL-22.

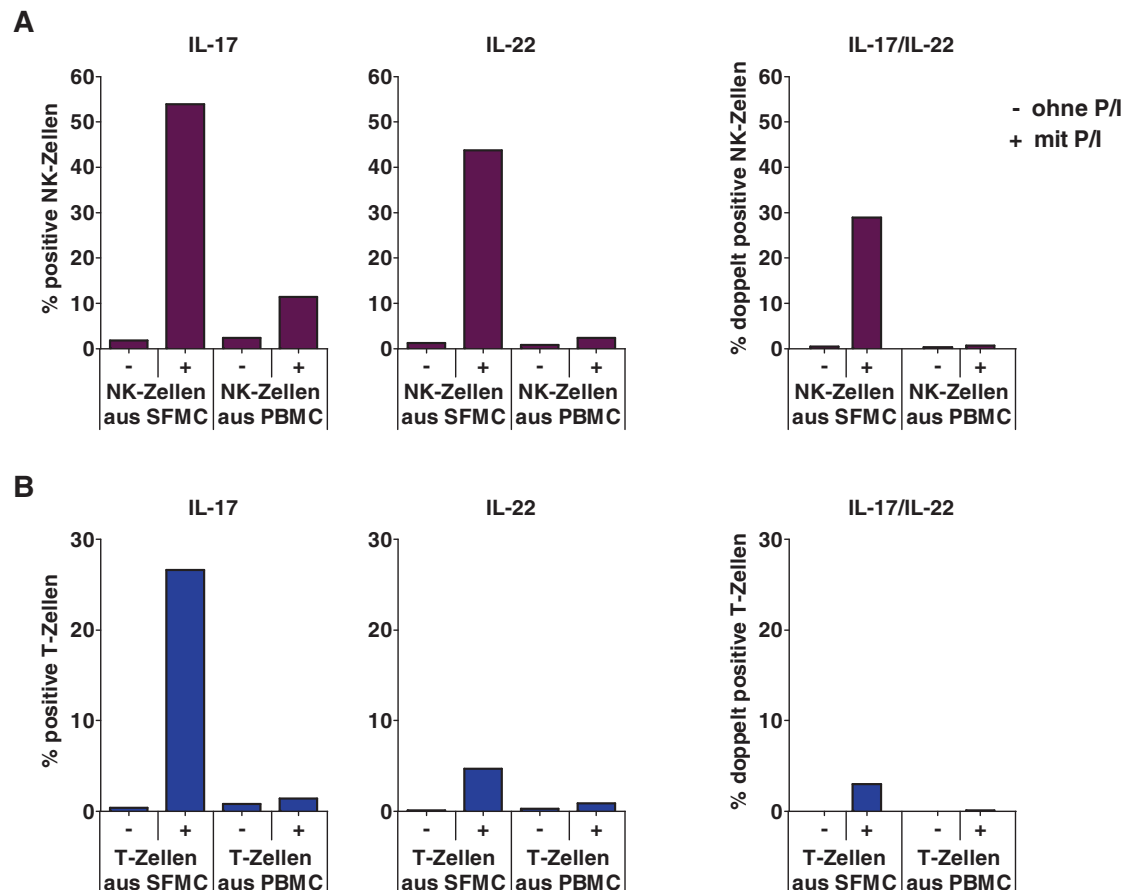


Abbildung 30: Intrazelluläre Färbung von IL-17 und IL-22 in synovialen und deren analogen peripheren NK- und T-Zellen eines Patienten mit Arthritis nach Stimulation mit PMA/Ionomycin.

Analyse der NK- (A, lila) und T-Zellen (B, blau) aus peripheren- und synovialen-mononukleären-Zellen (PBMC und SFMC) eines Patienten mit Arthritis. 12×10^6 PBMC und SFMC wurden mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin (P/I stimuliert) in Medium inkubiert bei 37°C. Nach zwei Stunden wurde zu jedem Ansatz 20 μ M Monensin zugeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Um die spontane Interleukin-Produktion zu erfassen wurde ein Ansatz mit Medium ohne PMA/Ionomycin mitgeführt (unstimuliert). Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die Oberflächenrezeptoren CD56 und CD3 und gegen intrazelluläres IL-17 und IL-22 gefärbt. Nach der Definition der synovialen Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität wurden die NK- (A, lila) und T-Zellen (B, blau) anhand ihrer CD56/CD3 Färbung separat analysiert. Angegeben sind die Prozente der IL-17 oder IL-22 und der IL-17/IL-22 doppelt-positiven NK- bzw. T-Zellen.

In Abbildung 23 (Seite 81) wurde die direkte Freisetzung von IL-17 und IL-22 in NK- und T-Zellen eines gesunden Spenders untersucht. Dabei konnten, auch nach Behandlung mit PMA/Ionomycin, keine NK-Zellen gefunden werden, die eines der beiden Interleukine exprimieren. Im Gegensatz dazu konnte drei Stunden nach Stimulation mit PMA und Ionomycin ein Anstieg der IL-22 positiven NK-Zellen aus dem Blut des hier untersuchten Arthritis-Patienten von 0,8% auf 2,4% und der IL-17 positiven NK-Zellen von 2,4% auf 11,4% beobachtet werden (Abbildung 30/A). Auch bei T-Zellen aus dem Blut des untersuchten Patienten fand ein Anstieg der IL-17 (von 0,8% auf 1,4%) oder IL-22 (von 0,3 auf 0,9%) positiven T-Zellen statt, jedoch in einem niedrigerem Umfang, als es bei synovialen NK-Zellen der Fall war (Abbildung 30/B).

Anders als bei Normalspendern kann bei Arthritis-Patienten bereits nach drei Stunden Stimulation mit PMA/Ionomycin die Expression von IL-17 und IL-22 auf mehr als 50% der synovialen NK-Zellen, bzw. 27% der synovialen T-Zellen nachgewiesen werden. Diese starke Zytokinproduktion lässt sich vor allem in SF und deutlich, wenngleich weniger stark, in peripheren NK- und T-Zellen des Arthritis-Patienten nachweisen, was darauf hindeutet, dass diese IL17- bzw. IL-22-produzierenden Zellen vorwiegend lokal im entzündlichen Gelenk vorhanden und damit an der sog. Th17-Immunantwort beteiligt sind. Dieser direkte Vergleich zwischen synovialen NK- und T-Zellen lässt vermuten, dass das entzündliche Milieu der SF bei Arthritis-Patienten durch IL-17 und IL-22 produzierende NK-Zellen maßgeblich in Richtung Th17 beeinflusst wird. Aus den Stimulationsdaten (Abbildung 28) kann vermutet werden, dass die Rezeptoren NKG2C, NKp46 und CD16 daran beteiligten sind.

2.5 Zytokinmuster in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zum Plasma der rheumatoiden Arthritis- und Arthrose-Patienten

Wie in Abschnitt E.2.3 (Seite 93) beschrieben, sind NK- und T-Zellen aus synovialen mononukleären Zellen (SFMC) in der Lage, Zytokine, die an der Aufrechterhaltung des entzündlichen Milieus in der Synovialflüssigkeit beteiligt sind, zu sezernieren. Im Folgenden soll daher die Zytokin-Verteilung in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zu den autologen Plasma-Proben aus dem Blut von Arthritis- und Arthrose-Patienten beschrieben werden. Dazu wurden die jeweiligen Proben mit der Multiplex-Technologie untersucht, die es erlaubt, bis zu 50 Analyte parallel in einer Probe zu quantifizieren. IL-22, ein weiteres Zytokin der Th17-Zellen ist hier ebenfalls dargestellt. Da IL-22 zum Zeitpunkt dieser Analysen nicht mit der Multiplextechnologie zu messen war, wurde dieses Zytokin hier mit der klassischen ELISA-Methode nachgewiesen (D.6, Seite 52).

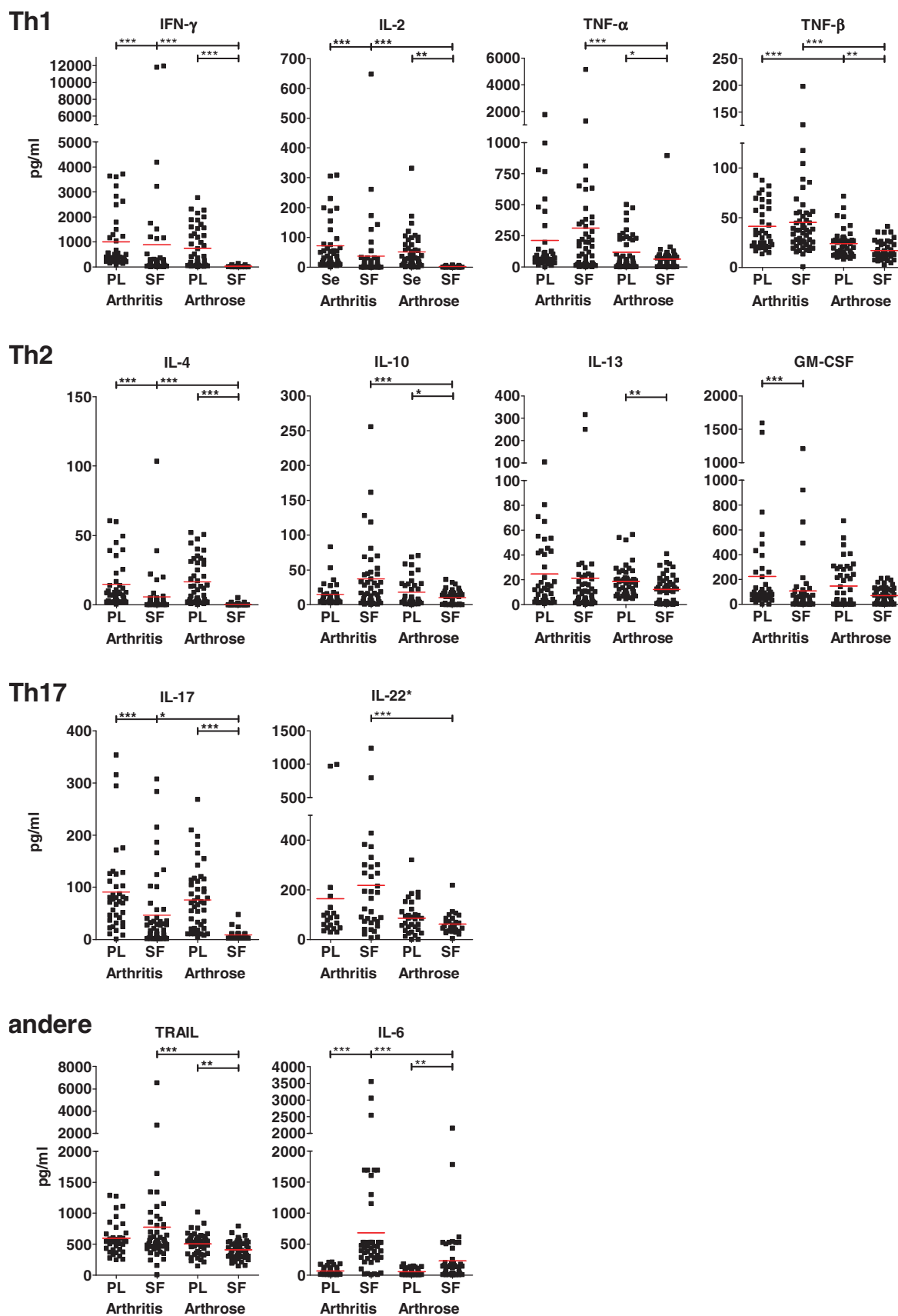


Abbildung 31: Zytokin in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose im Vergleich zu deren analogen Plasmen.

Angegeben sind die mit Hilfe der Multiplex-Technologie ermittelten Konzentrationen von Zytokinen (oben) in den Synovialflüssigkeiten (SF) und Plasmen (PL) von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose, geordnet nach ihrer Th1/Th2/Th17 Zugehörigkeit bzw. falls keine Eingruppierung in diese Gruppen erfolgen kann wurden die Zytokine unter „andere“ zusammen gefasst. Die Konzentrationen sind jeweils in pg/ml angegeben und die roten Linien markieren die Mittelwerte. RA-PL: n=38, RA-SF: n=51, OA-PL: n=45, OA-SF: n=48. *Da mit der Multiplex-Technologie kein IL-22 detektiert werden konnte, wurde dessen Konzentration mit einem ELISA ermittelt. Die Mittelwerte, Standardfehler und die Standardabweichungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang dargestellt (siehe Tabelle 9, Seite 141).

Anhand der in Abbildung 31 gezeigten Zytokine aus den SF und Plasmen der Patienten kann zunächst eine überraschend deutliche Unterscheidung zwischen der autoimmunen Arthritis und der nicht-autoimmunen Arthrose getroffen werden. Der Vergleich der Synovialflüssigkeiten (SF) und Plasmen (PL) der Arthritis-Patienten zeigt bei jedem, außer IL-4, dargestellten Zytokin eine signifikant höhere Konzentration als in den SF bzw. Plasma-Proben der Arthrose-Patienten.

Eine in der Literatur diskutierte Ursache der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung der rheumatoiden Arthritis ist die veränderte Th1/Th2 Balance in Richtung Th1, vor allem aber die erhöhte Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ . Auch in dem hier untersuchten Patientenkollektiv zeigt sich eine signifikant erhöhte Konzentration in der SF der Arthritis- im Vergleich zu den Arthrose-Patienten, wobei in den Plasmen der Arthrose-Patienten die Konzentration sogar signifikant höher ist als in den entsprechenden SF. Interessant ist IFN- γ , das in den Plasmen der Arthrose-Patienten in signifikant höheren Konzentrationen vorhanden ist als in den autologen SF. In den letzten Jahren wurde IL-17, wie IFN- γ , als weiteres Leitzytokin für die proinflammatorischen Prozesse im Synovium der Arthritis- und Arthrose-Patienten postuliert. Überraschenderweise ist IL-17 in den Plasmen beider Patientengruppen, gegenüber den SF, signifikant erhöht. Im Vergleich zwischen den SF der Patienten zeigt sich, dass die Konzentration von IL-17 bei den Arthritiden signifikant höher ist im Vergleich zu den Arthrosen, bei denen IL-17 in der SF nahezu vollständig fehlt. In der SF der Arthritiden ist IL-22, ein Zytokin, welches ebenfalls von Th17/Th22-Zellen produziert wird, gegenüber den Arthrosen signifikant erhöht. Der Befund der unterschiedlichen Repräsentanz verschiedener Zytokine deutet darauf hin, dass mit diesen Mikromilieuanalyten das lokale Geschehen im betroffenen Gelenk bezüglich des Entzündungsstatus von dem systemischen Geschehen im Blut unterschieden werden kann. Den TH1- und Th17-Zytokinen gegenüber stehen die Th2-Zytokine wie IL-4, IL-13, IL-10 und GM-CSF, welche in geringerer Konzentration, sowohl in den Plasmen als auch in den entsprechenden SF beider Patientengruppen, vorhanden sind. Da die Th-2-Zytokin-Konzentrationen deutlich unter denen der proinflammatorischen Th1/Th17-Zytokine liegen, kann hier von einer klinisch relevanten Th1/Th17-Dominanz in der SF der Arthritis, nicht aber der Arthrose-Patienten, ausgegangen werden. Dies wird unterstützt durch die hohe Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6, welche Ziele von

Therapeutika sind, die in der Behandlung von Arthritis-Patienten ihren Einsatz finden (z.B. Antikörper gegen $\text{TNF-}\alpha$ =Infliximab, Antikörper gegen IL-6R =Tocilizumab). Die in der Literatur beschriebene hohe Konzentration [103] in den SF der Arthritis-Patienten, im Vergleich zu der SF der Arthrose-Patienten, kann hier ebenfalls bestätigt werden. IL-6 ist im Vergleich zu den entsprechenden Plasmen der Arthrose-Patienten ebenfalls in deren SF erhöht. Dagegen kann kein Unterschied zwischen den Plasmen und den SF innerhalb der Arthrose-Gruppe beobachtet werden. Das proapoptotische Zytokin-Molekül TRAIL zeigt annähernd das gleiche Verteilungsmuster, welches ebenfalls bei $\text{TNF-}\beta$ zu beobachten ist. So sind beide Zytokine am höchsten in der SF und den Plasmen der Arthritiden zu finden, wenngleich kein Signifikanzniveau erreicht wird. Bei Patienten mit Arthrose hingegen ist die Konzentration von TRAIL und $\text{TNF-}\beta$ in den SF signifikant höher als in den entsprechenden Plasmen. Der Granulozyten und Makrophagen Kolonie Stimulierende Faktor (GM-CSF), welcher ebenfalls von T-Zellen, aber auch von synovialen Fibroblasten, NK-Zellen (Abbildung 1, Seite 3) u.a. sezerniert wird, ist sowohl bei den Arthritiden als auch bei den Arthrosen in der SF, gegenüber den entsprechenden Plasmen, erhöht. Dabei ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Plasmen oder der SF unter den Patientengruppen zu beobachten.

Die vergleichende Analyse der Th1/Th2/Th17 Zytokine in den SF und Plasmen von Arthritis- vs. Arthrose-Patienten zeigt eindrucksvoll, dass sich die akute, proinflammatorisch-autoimmune Entzündung der rheumatoiden Arthritis durch signifikant höhere Konzentrationen an $\text{IFN-}\gamma$, IL-17, IL-22, IL-2, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TNF-}\beta$, TRAIL und IL-6 definieren lässt. Damit unterscheidet sich die nicht autoimmune Entzündung der Arthrosen exakt durch das verminderte Vorhandensein oder sogar durch das Fehlen dieser proinflammatorischen Faktoren. Die Verschiebung hin zu einer Th1/Th17 Antwort ist ebenfalls durch die geringen IL-4, IL-13, IL-10 und GM-CSF Konzentrationen in der SF darstellbar. Außerdem unterscheidet sich das lokale Geschehen in der SF von dem Szenario in der Peripherie, z.B. durch das Vorhandensein von IL-17 im Plasma, nicht aber in der SF. Dies hat diagnostische Konsequenzen, da hieraus geschlossen werden kann, dass solche, zwischen SF und Plasma nicht korrelierenden Parameter im Blut, als diagnostische Biomarker ungeeignet sind, da sie keine Rückschlüsse über das lokale Entzündungsgeschehen erlauben.

2.6 Chemokin-vermittelte Migration von NK- und T-Zellen im Hinblick auf autoimmune und nicht-autoimmune Gelenkerkrankungen

In Abschnitt E.2.1 (Seite 84) konnte gezeigt werden, dass es in der Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten zu einer Anreicherung der CD56^{bright} NK-Zellen kommt. Da das Chemokinmilieu bei Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von NK- und T-Zellen spielt [104, 105], wurde zunächst untersucht, welche Chemokinrezeptoren auf CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen exprimiert sind. Anschließend sollte diese Rezeptorenexpression mit den Konzentrationen der entsprechenden Liganden in den Synovialflüssigkeiten bzw. den autologen Plasmen der Patienten korreliert werden. Das Migrationsverhalten von CD56^{bright}, CD56^{dim} NK-Zellen und T-Zellen gesunder Spender, auf die in der Synovialflüssigkeit oder in den Plasmen erhöhten Chemokine wurde funktionell untersucht.

2.6.1 Chemokinrezeptorexpression auf peripheren NK- und T-Zell-Subpopulationen gesunder Spender

Es ist bekannt, dass Chemokine das Migrationsverhalten von NK-Zellen beeinflussen [71]. Wie in Abschnitt B.3.2 (Seite 21) beschrieben, umfasst die Familie der Chemokine mehr als 40 strukturverwandte Mitglieder. Um die Unterschiede der Chemokinrezeptorverteilung auf CD56^{bright}/CD56^{dim} NK-Zellen und T-Zellen zu untersuchen, wurde die Expression der CCR5-7 sowie der CXCR1-4 durchflusszytometrisch analysiert. Da die Synovialinfiltrierenden CD56^{bright} NK-Zellen der Arthrose- und Arthritis-Patienten CD6⁻ sind, wurde die Chemokinrezeptorexpression auf peripheren NK- und T-Zellen eines repräsentativen gesunden Spenders in Beziehung zu der CD6-Expression gestellt.

Aus Abbildung 32/A geht hervor, dass von allen betrachteten Rezeptoren CXCR3 am stärksten auf CD56^{bright} NK-, sowie wenigen T-Zellen exprimiert ist. Dies geht einher mit der Beobachtung, dass ausschließlich CD6⁻ NK-Zellen CXCR3 exprimieren (Abbildung 32/C). Diese auf CD56^{bright} NK-Zellen restringierte CXCR3-Expression stellt daher einen Hinweis für eine Beteiligung der Liganden CXCL9 (MIG) und CXCL10 (IP-10) an der SF-Infiltration dar. CCR7 ist ein Chemokinrezeptor, dessen Expression, in der Literatur ebenfalls den CD56^{bright} NK-Zellen zugeschrieben wird und auf T-Zellen essentiell für das „homing“ zu den Lymphknoten ist [106]. Obwohl die Färbung dieses Rezeptors, im Vergleich zu den ebenfalls analysierten naiven CCR7⁺ T-Zellen, schwach ist, bestätigt diese Färbung die Ergebnisse der Literatur. Die Abwesenheit von CCR7 auf CD56^{dim} NK-Zellen korreliert ebenfalls mit deren Abwesenheit in Lymphknoten [114]. Auch der vor allem nach Aktivierung exprimierte CCR5 wird vermehrt von CD56^{bright} NK-Zellen exprimiert, in geringerem Ausmaß jedoch auch von einigen CD56^{dim} NK-Zellen. Dies unterstreicht die Beobachtung, dass CCR5 sowohl von CD6⁺ als auch CD6⁻ NK-Zellen exprimiert wird. Dagegen findet man eine nahezu

spiegelbildliche Verteilung von CXCR1 und CXCR2 auf den NK-Zell-Subpopulationen, da diese beiden Chemokinrezeptoren fast ausschließlich auf CD6⁺CD56^{dim} NK-Zellen exprimiert sind. Obwohl nur sehr wenige CD56^{dim} NK-Zellen CXCR4 oder CCR6 positiv sind, werden diese Rezeptoren exklusiv von dieser NK-Zell-Subpopulation exprimiert, was die Frage nach sich zieht ob die CXCL12 (SDF-1 α)-Konzentration in den SF so gering ist, dass nur wenige CD56^{dim} NK-Zellen chemotaktisch attrahiert werden.

Im Gegensatz zu NK-Zellen findet man auf nahezu allen T-Zellen CCR7 und CXCR4, dies unterstreicht, dass die Mehrzahl der peripheren T-Zellen naiv (CCR7⁺) sind und durch CXCR4 bzw. dessen Liganden CXCL12 (SDF-1 α) in die Peripherie rekrutiert wurden. Deutlich weniger T-Zellen exprimieren dagegen die Chemokinrezeptoren CCR5, CCR6 und CXCR3, wobei dies für naive T-Zellen gilt, da vor allem CCR5 nach TCR- oder IL-2-vermittelter Aktivierung induziert wird.

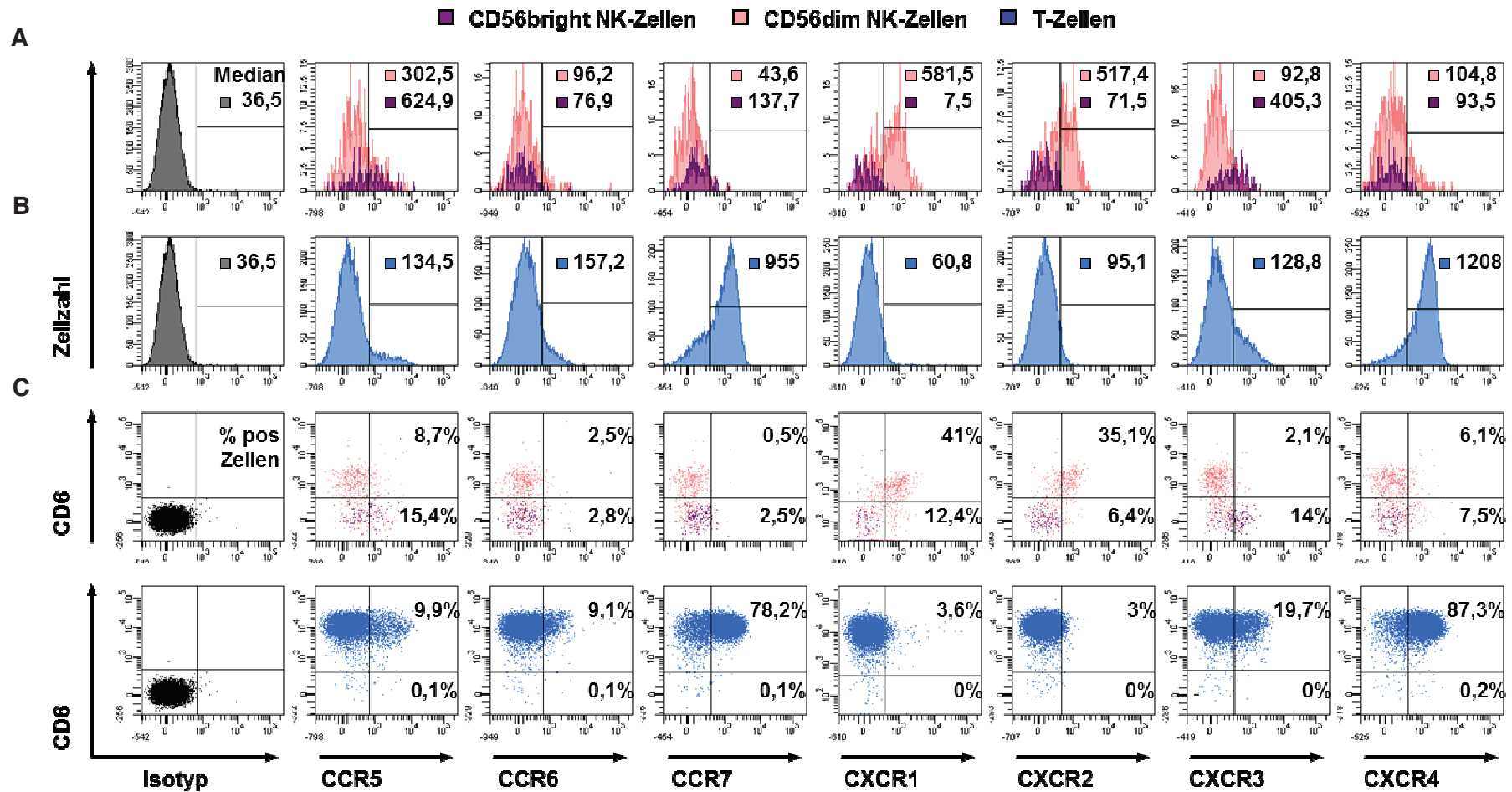


Abbildung 32: Durchflusszytometrische Färbung von Chemokinrezeptoren auf unstimulierten NK- und T-Zellen eines gesunden Spenders.

PBMC eines repräsentativen von 3 gesunden Spendern wurden mit Antikörpern gegen CD56, CD3, CD6 und den jeweiligen Chemokinrezeptoren für 30 Minuten bei 37°C gefärbt. In den Histogrammen ist die Färbung der Chemokinrezeptoren auf CD56^{dim} (A, hellblaue Kurve) und CD56^{bright} NK-Zellen (A, dunkelblaue Kurve) sowie auf T-Zellen (B, blau) dargestellt. Die angegebenen Werte stellen den Median der Gesamt CD56^{bright}, CD56^{dim} und T-Zellen dar. (C) Die Expression der Chemokinrezeptoren gemäß der CD6 Expression auf NK- und T-Zellen ist als Dotplot gezeigt. Die Werte in den Quadranten geben den Prozentsatz aus den Gesamt NK- bzw. T-Zellen an. +

2.6.2 Chemokinemuster in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zum Plasma der rheumatoiden Arthritis- und Arthrose-Patienten

Im vorangegangenen Abschnitt wurde das Chemokinrezeptormuster von CD56^{dim}/ CD56^{bright} NK-Zellen und T-Zellen analysiert. Da das Chemokininmilieu während der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Lymphozyten spielt, wurden die NK- und T-Zell-relevanten Chemokine in der Synovialflüssigkeit (SF) und in den Plasmen von Arthritis- und Arthrose-Patienten mit Hilfe der Multiplex-Technologie analysiert.

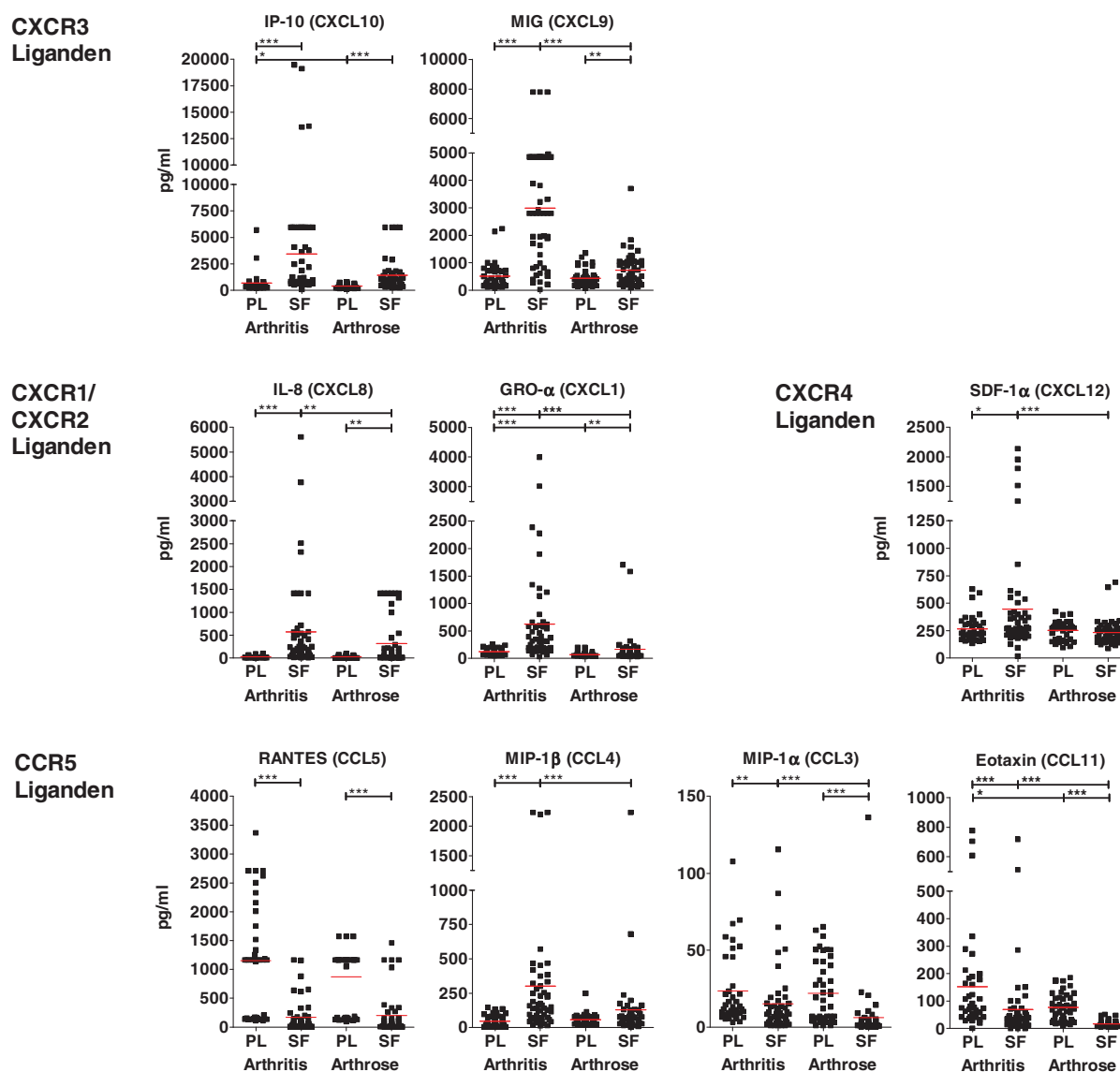


Abbildung 33: Chemokine in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose im Vergleich zu deren autologen Plasmen.

Angegeben sind die mit Hilfe der Multiplex-Technologie ermittelten Konzentrationen von Chemokinen, zugeordnet zu ihren jeweiligen Chemokinrezeptoren, in den Synovialflüssigkeiten (SF) und Plasmen (PL) von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose. Die Konzentrationen sind jeweils in pg/ml angegeben. Die roten Linien markieren die Mittelwerte. RA-Se n=38, RA-SF n=51, OA-Se n=45, OA-SF n=48. Die Mittelwerte, Standardfehler und die Standardabweichungen sind im Anhang dargestellt (siehe Tabelle 10, Seite 141).

Dargestellt sind die gemessenen Chemokine, zugeordnet zu ihrem entsprechenden Rezeptor. Aus dem vorhergehenden Abschnitt geht hervor, dass ausschließlich CD56^{bright} NK-Zellen den Chemokinrezeptor CXCR3 exprimieren. Tatsächlich sind die CXCR3-Liganden CXCL10 (IP-10) und CXCL9 (MIG), im Vergleich zu den autologen Plasmen, in den SF beider Patientengruppen erhöht. Dem entgegen stehen die hohen Konzentrationen der CXCR1-Liganden CXCL1 und CXCL8 (GRO- α und IL-8, binden auch an CXCR2) in den SF beider Patientengruppen. Da CXCR1 ausschließlich von CD56^{dim} Zellen exprimiert wird sollten diese theoretisch ebenfalls in die SF rekrutiert werden. Durch den Befund der erhöhten CXCL1 und CXCL8 Konzentrationen, vor allem in den SF der Arthritis-Patienten, können diese Chemokine nicht für das veränderte Vorkommen der CD56^{dim} NK-Zellen in der SF verantwortlich gemacht werden. Das gleiche Muster findet sich auch bei CXCL12, einem Chemokin, dass ausschließlich an den CXCR4 Rezeptor auf CD56^{dim}- und T-Zellen bindet. CCR5 ist ein Chemokinrezeptor der hingegen sowohl auf CD56^{bright} wie auch auf CD56^{dim} NK-Zellen zu finden ist. Hier zeigt sich, dass die Konzentration der CCR5 Liganden CCL5 und CCL3 in den Plasmen beider Patientengruppen im Vergleich zur SF erhöht ist. Dem gegenüber steht CCL4, ebenfalls ein Ligand des CCR5 Rezeptors, der in den SF erhöht ist. Analog zu CCL11 zeigen CCL5 und CCL3, dass einige Chemokine im Plasma höher konzentriert sind als in der SF, wodurch die Balance zwischen peripherem Repertoire und der Infiltration in Entzündungen aufrecht erhalten wird.

Wie gezeigt wurde, exprimieren T-Zellen u.a. die Chemokinrezeptoren CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3 und CXCR4. In Abschnitt E.2.1.1 (Seite 84) wurde eine geringe Abnahme der T-Zellen (PBMc: 97,7 \pm 1,8%, SFMC: 89,4 \pm 5,1%) in der Synovialflüssigkeit der Arthrose-Patienten beschrieben. Jedoch kann dies nicht mit dem Chemokinmuster in den untersuchten Patientenproben korreliert werden, da die Konzentration der relevanten Chemokine sowohl in den Synovialflüssigkeiten (z.B. CXCL12, CCL4), als auch in den Plasmen (z.B. CCL5, CCL11) der Patienten erhöht sein kann. Die Liganden von CCR7 sind CCL19 (MIP-3b) und SLC (*engl. secondary lymphoid-tissue chemokine*, CCL21), der Ligand von CCR6 ist CCL20 (MIP-3 α). Da während der Anfertigung dieser Arbeit keines dieser Chemokine mittels der Multiplex-Technologie detektiert werden konnte, sind diese hier nicht dargestellt.

2.6.3 Migrationsverhalten der CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zell- Populationen auf chemotaktische Lockstoffe

Wie in Abschnitt 1.5.1 beschrieben, produzieren NK-Zellen selbst nach Rezeptorstimulation u.a. die Chemokine CXCL10 (IP-10), CCL5 (RANTES), CXCL12 (SDF-1 α), CXCL1 (GRO- α) und CXCL8 (IL-8). In diesem Versuch wurde das Migrationsverhalten der CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zell-Subpopulationen auf die von ihnen selbst sezernierten Chemokine, repräsentiert durch CXCL10 (IP-10), CXCL1 (GRO- α), CXCL12 (SDF-1 α), CXCL8 (IL-8) und CCL5 (RANTES), hin untersucht werden. Dazu wurden unstimulierte PBMC von drei gesunden Spendern in die obere Kammer einer „Boyden Kammer“ in einem neutralen, FBS freien Medium gegeben. In die untere Kammer wurden 100 ng/ml des jeweiligen Chemokins, bzw. Medium ohne Chemokin als Kontrollansatz gegeben. Nach vier Stunden, in denen die Zellen durch die Zellsiebbarriere migrieren konnten, wurden die migrierten Zellen aus der unteren Kammer entnommen und durchflusszytometrisch analysiert.

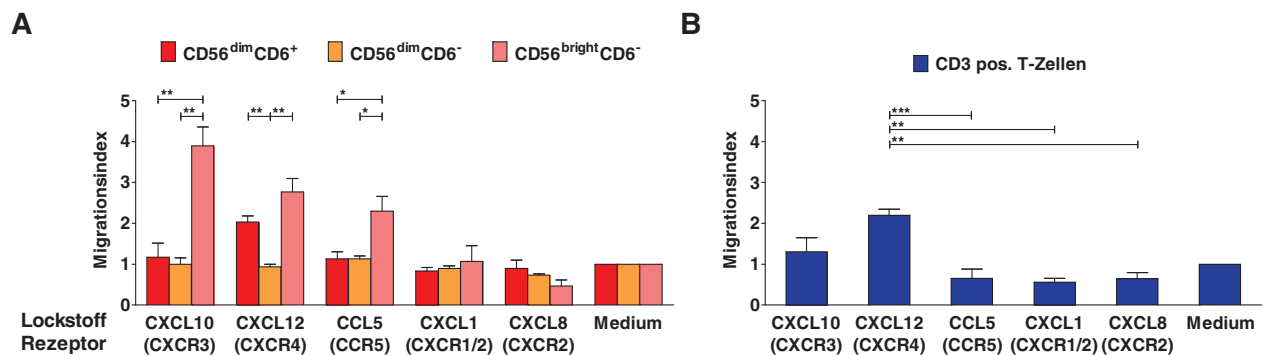


Abbildung 34: Chemotaktisches Verhalten von NK-Zellen (CD56^{dim} und CD56^{bright}) und T-Zellen.

Das chemotaktische Verhalten von CD56^{dim}CD6⁺ (rot), CD56^{dim}CD6⁻ (gelb) und CD56^{bright}CD6⁻ NK-Zellen (A, rosa) und T-Zellen (B, blau) wurde mit Hilfe einer Boyden-Kammer untersucht (siehe Methoden 7). Dazu wurden in die obere Zellsiebkammer (5 μ m Porengröße) 400.000 PBMC eines gesunden Spenders in RPMI III mit 0,5% BSA, und in die untere Kammer je 100 ng/ml eines jeden Chemokins gelöst in dem gleichen Medium gegeben. Zur Bestimmung der spontanen Migration wurde ein Ansatz ohne Chemokin mitgeführt. Nach 4 Stunden wurden die migrierten Zellen aus der unteren Kammer mit rezeptorspezifischen Antikörpern gegen CD56, CD3 und CD6 gefärbt. Die genaue Zellzahl der migrierten Zellen wurde durch die durchflusszytometrische Messung von 5000 CompBeadsTM ermittelt (siehe Methodenabschnitt 7, Seite 52). Dargestellt ist der Migrationsindex, der sich wie folgt errechnet: Σ migrierter Zellen (Chemokin) / Σ migrierter Zellen (ohne Chemokin). n=3

In Abbildung 34 ist der Migrationsindex der migrierten NK-Zellen (A), getrennt nach ihrer CD6 Expression CD56^{dim}CD6⁺ (rot), CD56^{dim}CD6⁻ (gelb) und CD56^{bright}CD6⁻ (rosa), sowie der migrierten T-Zellen (B, blau), gemäß der als Lockstoff verwendeten Chemokine dargestellt. Verglichen mit dem Kontrollansatz ohne Lockstoff migrierten, innerhalb von vier Stunden die 3,8fache Menge an (Migrationsindex) CD56^{bright}-NK-Zellen zu dem CXCR3 Liganden (CD56^{dim}CD6⁺ zu CD56^{bright}CD6⁻ p=0,0087, CD56^{dim}CD6⁻ zu CD56^{bright}CD6⁻ p=0,0037)

CXCL10, was die Spezifität der CXCL10-vermittelten Migration durch CXCR3-Bindung bestätigt. Das gleiche Muster zeigt sich, wenn auch schwächer, bei dem CCR5 Liganden CCL5 ($CD56^{\text{dim}}CD6^+$ zu $CD56^{\text{bright}}CD6^-$ $p=0,0425$, $CD56^{\text{dim}}CD6^-$ zu $CD56^{\text{bright}}CD6^-$ $p=0,0335$). Diese Beobachtung geht einher mit der stärkeren CXCR3 und CCR5 Expression auf $CD56^{\text{bright}}$ NK-Zellen im Vergleich mit $CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen (siehe Abbildung 32, Seite 106). Ein erhöhtes Migrationsverhalten der $CD6^-CD56^{\text{bright}}$ im Vergleich zu den $CD6^-CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen zeigt sich auch bei dem CXCR4 Liganden CXCL12. Jedoch konnte hier keine erhöhte CXCR4 Expression auf den $CD56^{\text{bright}}$, im Vergleich zu den $CD6^-CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen gezeigt werden. Bei der CXCL12-vermittelten Migration ist eine Trennung zwischen den migrierenden $CD6^+$ und $CD6^-CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen zu beobachten, da die $CD6^+CD56^{\text{dim}}$ wie die $CD56^{\text{bright}}$ NK-Zellen migrieren ($CD56^{\text{dim}}CD6^+$ zu $CD56^{\text{dim}}CD6^-$ $p=0,0023$, $CD56^{\text{dim}}CD6^-$ zu $CD56^{\text{bright}}CD6^-$ $p=0,0054$). Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass bei bestimmten Chemokinen CD6 an der Migration entscheidend beteiligt ist. Interessanterweise löst keiner der beiden CXCR1/2 Liganden CXCL1 (GRO- α) und CXCL8 (IL-8) die Migration von $CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen aus, obwohl die CXCR1/2 Rezeptoren exklusiv auf den $CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen zu finden sind.

$CD56^{\text{bright}}$ NK-Zellen exprimieren, anders als $CD56^{\text{dim}}$ den Chemokinrezeptor CXCR3 auf ihrer Oberfläche. Hingegen exprimieren vorwiegend die $CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen Zellen CXCR1 und CXCR2. Ein Rezeptor den beide Populationen exprimieren ist CCR5. In den Synovialflüssigkeiten der Arthrose und Arthritis-Patienten gibt es signifikant hohe Liganden-Konzentrationen der CXCR3 und CCR5 Rezeptoren die tatsächlich in signifikant höherer Konzentration vorliegen als in den entsprechenden Plasmen. Allerdings gibt es von ihnen auch Liganden dort in signifikant niedriger Konzentration vorhanden sind. Daher kann die Abwesenheit der $CD16^+CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen nicht mit der Abwesenheit ihrer rekrutierenden Chemokine beantwortet werden. Dennoch scheint die Infiltration der $CD56^{\text{bright}}$ NK-Zellen durch die hohen Konzentrationen der CXCR3 Liganden CXCL10 (IP-10) und CXCL9 (MIG) unterstützt zu werden.

F. Diskussion

1 Relevanz der CD6 Expression auf die Funktion peripherer NK- und T-Zellen

Humane NK-Zellen aus dem Blut gesunder Spender werden anhand der Expressionsdichte von CD56 und CD16 in die beiden Subpopulationen CD56^{bright}CD16⁻ und CD56^{dim}CD16⁺ eingeteilt. Neben der phänotypischen Einteilung sind beide Populationen mit verschiedenen Effektorfunktionen assoziiert. So exprimieren erstere wenig Perforin und können große Mengen an Zytokinen und Chemokinen produzieren, in geringem Umfang aber auch zytotoxisch wirken. Dagegen produzieren die CD56^{dim} NK-Zellen deutlich weniger Zytokine und Chemokine, haben aber eine stärkere zytotoxische Effektorfunktion. In Abbildung 12/B/D (Seite 55) konnte gezeigt werden, dass die größte Subpopulation der peripheren CD56^{dim} NK-Zellen CD6 exprimiert. Darüber hinaus konnte in funktionellen Analysen gezeigt werden, dass die Stimulation dieses Rezeptors zu einer Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine führt.

CD6 ist ein Typ B-Scavenger-Rezeptor-Glykoprotein, welches an das Adhäsionsmolekül ALCAM (CD166) bindet. Anhand dieses Markers lassen sich CD56^{dim} NK-Zellen in zwei Subpopulationen unterteilen: CD56^{dim} Zellen, die kein CD6 exprimieren und CD56^{dim} Zellen, die CD6⁺ sind und mit durchschnittlich 70,5% die Hauptpopulation darstellen. CD56^{bright} Zellen sind hingegen immer CD6⁻. Sowohl CD56 als auch CD16 sind Rezeptoren, deren Expression auf NK-Zellen modulierbar ist. So regulieren NK-Zellen nach Inkubation mit IL-2 die Expression ihres CD56 Rezeptors nach oben, so dass eine Unterscheidung zwischen CD56^{bright} und CD56^{dim}, anhand der Expression dieses Markers allein nicht mehr möglich ist (Daten nicht gezeigt). Ebenso nimmt die Oberflächenexpression des CD16 Rezeptors auf NK-Zellen in Anwesenheit von IL-2 ab, aber auch während der Degranulation (Abbildung 17/A, Seite 64). Da sich die CD6 Expression weder in Anwesenheit von IL-2 noch nach funktionellen Ereignissen wie Degranulation oder der Sezernierung von Zytokin/Chemokin verändert, stellt es einen stabileren Unterscheidungsmarker der NK-Subpopulationen dar als CD56 oder CD16. T-Lymphozyten exprimieren ebenfalls CD6 auf ihrer Oberfläche und wurden daher als Vergleich zu NK-Zellen parallel untersucht. Anders als NK-Zellen sind nahezu alle T-Zellen CD6⁺ (98,4%), aber CD16⁻ (Abbildung 12/E, Seite 55).

Jianhua Yu *et al.* beschrieben kürzlich anhand des CD94/NKG2A Heterodimers ebenfalls drei NK-Zell-Subpopulationen. Danach exprimiert eine CD56^{dim} NK-Zell-Fraktion CD94 in einer Dichte, die zwischen den stark CD94 positiven CD56^{bright} und einer schwächer exprimierenden CD56^{dim} Population liegen [33]. Darüber hinaus nehmen die Autoren an, dass es sich bei dieser Population um ein Zwischenstadium im Differenzierungsprozess von

den CD56^{bright} zu den CD56^{dim} NK-Zellen handelt. Die Expression von CD94 wurde auf den in dieser Arbeit definierten Subpopulationen ebenfalls untersucht. Dabei zeigt sich eine identische Verteilung, wonach die CD56^{bright}CD6⁻ Zellen stark CD94 positiv, gefolgt von den CD6⁺CD56^{dim} Zellen und den CD6⁺CD56^{dim} Zellen, die am wenigsten CD94 exprimieren (Abbildung 13/C, Seite 57). Diese Korrelation spiegelt sich auch in der Verteilung von NKG2A wieder, welches stets als Heterodimer mit CD94 vorliegt. NKG2D, das dritte Mitglied der hier untersuchten C-Typ-Lektin-Rezeptoren und NKp30 bilden hingegen eine Ausnahme. So zeigte sich in den von Jianhua Yu et.al. definierten Subpopulationen eine einheitliche Verteilung der beiden Marker, die jedoch in den hier definierten Populationen nicht beobachtet werden kann. Wie alle hier betrachteten Rezeptoren, waren auch die aktivierenden NCR NKp30 und NKp46 auf allen NK-Zellen, zum Teil jedoch sehr schwach exprimiert. Die Expression von NKp46 variierte in den drei Populationen. So wiesen die CD56^{bright} NK-Zellen die höchste Expressionsdichte auf. Der aktivierungs-abhängige Marker NKp44 wird dagegen kaum von ruhenden, peripheren NK-Zellen exprimiert. Lediglich eine geringe Anzahl an CD56^{bright}CD6⁻ NK-Zellen exprimieren diesen Rezeptor (10,4%) konstitutiv in der Peripherie.

T-Lymphozyten wurden ebenfalls auf die Expression dieser Rezeptoren untersucht. Wie erwartet konnten keine T-Zellen gefunden werden, welche die NK-spezifischen NCR (NKp30, NKp46, NKp44) exprimieren. Je nach Spender konnten jedoch T-Zellen detektiert werden, die das Heterodimer CD94/NKG2A exprimierten. Es konnten ebenfalls bestätigt werden, dass eine Subpopulation der T-Zellen den aktivierenden NKG2D Rezeptor konstitutiv exprimiert (Abbildung 13/D, Seite 57), welche zu den CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen zählt (Daten nicht dargestellt).

NK-Zellen besitzen zwei wesentliche Effektorfunktionen. Zum einen sind sie in der Lage, nach Stimulation ihrer aktivierenden Rezeptoren (NKG2D, aKIR) HLA-Klasse-I negative Zielzellen zu lysieren und zum andern Zytokine und Chemokine freizusetzen, wodurch sie eine immunmodulatorische Funktion ausüben. Entsprechend publizierte Ergebnissen weisen CD56^{dim} NK-Zellen ein stärkeres Degranulationspotential in Anwesenheit der HLA-Klasse-I negativen Tumorzelllinien K562 (Erythroblasten-Leukämie-Zelllinie) und 721.221 (EBV-transformierte B-Zelllinie) auf als die CD56^{bright} NK-Zellen. Dagegen scheint die ebenfalls HLA-I negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie Daudi in gleichem Maß die Degranulation von CD56^{dim} und CD56^{bright} Zellen auszulösen (Abbildung 17/C, Seite 64). Diese Beobachtung geht möglicherweise mit der 48 stündigen IL-2 Vorstimulation der NK-Zellen einher. Vergleicht man jedoch die CD6⁻ mit den CD6⁺ NK-Zellen, zeigt sich, dass vor allem die NK-Zellen nach Kontakt mit den Zielzellen degranulieren, die CD6 exprimieren. Auch die unterschiedliche Expression des CD6 Liganden ALCAM auf den Zielzellen hat keinen Einfluss auf diese Beobachtung. So nehmen die degranulierenden CD6⁺ NK-Zellen in

Anwesenheit der ALCAM negativen Zelllinie K562 im Vergleich zur Kokultivierung mit den ALCAM positiven 721.221 (Abbildung 16, Seite 3) weder zu, was auf eine aktivierende Rezeptor-Ligand-Interaktion hindeuten würde, noch nehmen sie ab, was für eine inhibierende Interaktion spräche. Eine direkte Stimulation mit verschiedenen zellkulturplattengebundenen Antikörpern gegen CD6 (antiCD6-MT606, -MT411, -BL, -MEM98) kann ebenfalls keine Degranulation bei NK-Zellen auslösen (Abbildung 18/C, Seite 67) wie sie bei der Stimulation der aktivierenden Rezeptoren CD16 und NKp46 der Fall ist.

T-Zellen benötigen für ihre vollständige Aktivierung ein kostimulierendes Signal, etwa die Bindung von CD28 an die Liganden B7-1 oder B7-2. Daher ist es denkbar, dass auch CD6 eine kostimulierende Rolle auf NK-Zellen einnimmt. Im Vergleich der Stimulation verschiedener aktivierender Rezeptoren in An- und Abwesenheit von CD6 zeigt jedoch keinen Unterschied. T-Zellen, die CD6 in deutlich größerem Umfang exprimieren, degranulieren ebenfalls nicht in Anwesenheit ALCAM exprimierender Zielzellen oder nach direkter Stimulation des Rezeptors (Abbildung 17/D - Abbildung 18/D, Seite 64-67). Lediglich nach Stimulation des CD3 Rezeptors degranulieren durchschnittlich 37,5% der T-Zellen, wobei dies sowohl in An- als auch in Abwesenheit von CD6 der Fall ist, womit eine kostimulierende Funktion von CD6 für die Zytotoxizität auch hier ausgeschlossen ist (Abbildung 19/D, Seite 70).

Die Stimulation von CD6 auf NK-Zellen bewirkt vor allem in Anwesenheit von IL-2, eine Freisetzung von Chemokinen wie CCL4 (MIP-1 β), CXCL12 (SDF-1 α), CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CXCL1 (GRO- α) und Zytokine wie IFN- γ , IL-17, IL-13, TNF- α , TNF- β , GM-CSF, IL-6 und TRAIL. Ein verstärkender Effekt von IL-2-Rezeptorsignalen wurde bereits für die zytotoxische und Zytokin sekretorische Funktion in Anwesenheit anderer Rezeptoren (z.B. CD16) beschrieben [107]. Die rezeptorvermittelte Freisetzung mancher Zytokine ist zudem zeitabhängig. So produzieren NK-Zellen intrazellulär bereits sechs Stunden nach CD6 Stimulation Zytokine wie IFN- γ und TNF- α (Abbildung 22/C, Seite 79), wobei hier bereits der kostimulierende Einfluss von IL-2 sichtbar wird. Analysen des Kulturüberstands von CD6 stimulierten Zellen nach 24 und 72 Stunden zeigten, dass sich die IFN- γ -Konzentration fast sechsfach und die von TNF- α dreifach gegenüber dem Medium erhöht (Abbildung 21, Seite 77). Da die CXCL10 Produktion IFN- γ abhängig ist, konnte keine intrazelluläre Produktion nach 6 Stunden CD6 Stimulation oder in Anwesenheit von PMA/Ionomycin beobachtet werden (Abbildung 22, Seite 79). Damit ist dessen Freisetzung, welche nach 24 und 72 Stunden im Kulturüberstand von NK-Zellen detektiert werden konnte, möglicherweise eine Konsequenz aus der vorausgehenden CD6 vermittelten Sezernierung von IFN- γ (Abbildung 20, Abbildung 21, Seite 74, 77). Dagegen sind T-Zellen zwar in der Lage, IFN- γ oder TNF- α nach TZR-Stimulation zu produzieren, jedoch nicht durch eine CD6-Stimulation. Die Konzentration anderer Zytokine, beispielsweise CXCL8, nimmt ebenfalls mit länger

andauernder Rezeptorstimulation von NK-Zellen zu. Jedoch führt der gleichzeitige Anstieg anderer Zytokine im Kulturüberstand bereits zusätzlich zu einer CD6 unabhängigen Stimulation (Abbildung 21, Seite 77), die durch das Zytokinmilieu in den Kulturen zu erklären ist.

CD4⁺ Th17-Zellen sind neben den klassischen Th1- und Th2-Zellen eine weitere Subgruppe zytokinproduzierender T-Lymphozyten. Der wichtige Stellenwert autoreaktiver Th17-Zellen konnte in Mausmodellen mit unterschiedlichem autoimmunem Hintergrund gezeigt werden [57]. Da die NK-Zellen in dieser Arbeit auch im Kontext der Autoimmunkrankheit rheumatoide Arthritis betrachtet wurden, lag die Frage nahe, ob NK-Zellen ebenfalls die Fähigkeit besitzen, IL-17 oder IL-22 zu produzieren. In Abbildung 20 (Seite 74) konnte gezeigt werden, dass periphere NK-Zellen nach 24 Stunden Stimulation ihres CD16 oder CD6 Rezeptors tatsächlich in der Lage sind, geringe, aber messbare Mengen an IL-17 zu produzieren, wobei ein Konzentrationsanstieg nach 72 Stunden zeigt, dass NK-Zellen über die Zeit, möglicherweise unterstützt durch das sich in vitro anreichernde Zytokinmilieu, mehr IL-17 produzieren (Abbildung 21, Seite 77). Neben IL-17 wurde auch IL-22 als Hauptzytokin der Th17-Zellen beschrieben. Da nach 24 Stunden nur wenig IL-17 im Überstand von stimulierten NK-Zellen zu finden war, überraschte es nicht, dass nach vier Stunden unspezifischer Stimulation mit PMA/Ionomycin intrazellulär kein IL-17 nachweisbar war. Zum Zeitpunkt der Analysen konnte IL-22 nicht mit der Multiplextechnologie detektiert werden, weshalb zunächst versucht wurde, dieses Zytokin intrazellulär nachzuweisen (Abbildung 23, Seite 81). In diesen intrazellulären Färbungen konnte nach sechs Stunden PMA/Ionomycin-Behandlung auch IL-22 nicht detektiert werden. Da CD4⁺ T-Zellen die Zytokine IL-23, IL-12 und IL-6 zur Differenzierung in IL-17/22 produzierende Th17-Zellen benötigen, ist es denkbar, dass NK-Zellen ebenfalls die Anwesenheit weiterer Zytokine für die Produktion von IL-17 und IL-22 benötigen. Zudem konnte gezeigt werden, dass es im Überstand von NK-Zellen, die mit einem Isotyp-Antikörper in Anwesenheit von IL-2 für 72 Stunden stimuliert wurden, ebenfalls zu einem, wenn auch geringeren, Anstieg der IL-17 Produktion kommt (Abbildung 21, Seite 77). Des Weiteren wird diese Hypothese von einer kürzlich veröffentlichten Studie unterstützt, in der NK-22 Zellen nach Stimulation mit IL-1 β und IL-7 in der Lage sind, IL-17 zu produzieren. Diese Beobachtungen sind vor allem im Kontext von Autoimmunerkrankungen von Bedeutung, da im entzündeten Gewebe ein meist proinflammatorisches Milieu vorliegt, das eine derartige Th17/Th22 Antwort unterstützen könnte. Diese Vermutung konnte eindrucksvoll für NK-Zellen bestätigt werden, da in synovialen, nicht jedoch peripheren NK-Zellen, die sich in der SF von Arthritis-Patienten in einem proinflammatorischen Milieu befanden, nach 6 Stunden sowohl IL-17 als auch IL-22 intrazellulär nachgewiesen werden konnte (Abbildung 29, Seite 98), worauf später genauer eingegangen wird.

Zusammengefasst zeigen all diese Ergebnisse, dass die CD6 Rezeptorexpression auf einer Subpopulation von CD56^{dim} NK-Zellen weder alleine noch in Kostimulation mit anderen aktivierenden Rezeptoren oder in Interaktion mit dem Liganden ALCAM zur Induktion der zytotoxischen Effektorfunktion führt. Die CD6 Stimulation führt dagegen zu einer Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen, wie IFN- γ , CXCL8 und IL-17, die in Anwesenheit von IL-2 verstärkt ist.

2 NK- und T-Zellen im Kontext autoimmuner und nicht-autoimmuner Gelenkerkrankungen

2.1 Die selektive Infiltration von CD6⁻CD56^{bright} NK-Zellen in die Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten

In der Synovialflüssigkeit (SF) der hier untersuchten Arthritis- und Arthrose-Patienten konnte die Anreicherung der CD56^{bright} NK-Zellen, wie sie in der Literatur beschrieben wurde, bestätigt werden [102]. Die CD6-Expression auf NK-Zellen zeigt dabei eine stabilere Korrelation mit der NK-Zell-Infiltration als CD56 oder CD16. Anhand dieses Markers konnte gezeigt werden, dass in der SF von Arthritis- und Arthrose-Patienten eine Dominanz der CD56^{bright}CD16⁻CD6⁻ NK-Zellen gegenüber den in der Peripherie und der Synovialmembran vorherrschenden CD56^{dim}CD16⁺CD6⁺ NK-Zellen vorliegt. Des Weiteren konnte hier gezeigt werden, dass die infiltrierenden NK- und T-Zellen in der Lage sind, das inflammatorische Milieu in der SF aufrecht zu erhalten, welches unter anderem wiederum zur Rekrutierung von Leukozyten wie NK- und T-Zellen beiträgt.

Die Beobachtung, dass CD56^{bright} NK-Zellen in der SF angereichert sind, wirft die Frage auf, ob es sich bei dieser vorherrschenden NK-Zellpopulation tatsächlich um CD56^{bright} NK-Zellen handelt oder ob hier NK-Zellen vorliegen, deren Phänotyp beispielsweise aufgrund des proinflammatorischen Milieus verändert ist. Der Hauptmarker für NK-Zellen ist CD56, anhand dessen sich ruhende NK-Zellen der Peripherie in CD56^{dim} und CD56^{bright} unterteilen lassen. Allerdings verstärken NK-Zellen die CD56 Expression durch Stimulation mancher Rezeptoren oder unterschiedlicher Zytokine wie IL-2 und eine Unterscheidung allein durch CD56 ist nicht mehr möglich [108]. Ein weiterer wichtiger Marker für die Unterscheidung der beiden NK-Zell-Subpopulationen ist der Fc-Rezeptor CD16. In der Peripherie von gesunden Spendern exprimieren vor allem CD56^{dim} NK-Zellen CD16, aber mit 3,1% nur sehr wenige CD56^{bright} NK-Zellen (Abbildung 12, Seite 55) [109]. In der SF der hier untersuchten Arthritis-Patienten konnte dagegen eine Anreicherung von CD16⁺CD56^{bright} NK-Zellen (28%) beobachtet werden, welche in geringerem Umfang ebenfalls bei Patienten mit Arthrose feststellbar war. In der Literatur werden NK-Zellen aus der SF von Arthritispatienten als

aktivierte Zellen beschrieben, da sie, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit Kniegelenkstraumata, die Aktivierungsmarker CD69 und CD25 vermehrt exprimieren. Daher ist es möglich, dass die erhöhte CD16 Expression auf CD56^{bright} NK-Zellen mit einer Aktivierung durch das proinflammatorische Zytokinmilieu einhergeht. Allerdings konnten die Autoren dieser Studie auch eine vermehrte Expression von NKp44 zeigen, die in dem hier untersuchten Kollektiv nicht bestätigt werden konnte [110].

Neben der Frage, ob die CD16⁺ Zellen in der SF CD56^{dim} NK-Zellen sind, welche nach Aktivierung entweder die CD56 Expression erhöhen und somit als CD56^{bright} erscheinen [111] oder CD56^{bright} NK-Zellen sind, die nach Aktivierung die CD16 Expression erhöhen [112], ist es auch vorstellbar, dass die CD56^{bright}CD16^{dim} NK-Zellen eine intermediäre Differenzierungsstufe zwischen den CD56^{bright}CD16⁻ und den CD56^{dim}CD16⁺ darstellen [4, 33]. Die Entwicklung der NK-Zellen und die Beziehung der Subpopulationen zueinander wird bis heute kontrovers diskutiert. Zum einen werden die CD56^{bright} als Vorläufer der CD56^{dim} NK-Zellen betrachtet oder als Zellen welche aus CD56^{dim} NK-Zellen entstehen können und zum anderen wird ein gemeinsamer Vorläufer beschrieben, der durch unterschiedliche Signale entweder in CD56^{dim} oder CD56^{bright} NK-Zellen differenziert. Untersuchungen zu diesem Thema sind jedoch erschwert, da murine NK-Zellen kein CD56 exprimieren und der Ort der terminalen NK-Zell-Differenzierung nach wie vor nicht identifiziert wurde. Das Fehlen von Differenzierungsmarkern stellt hierbei ein weiteres Hindernis dar. Dennoch konnten verschiedene Studien zeigen, dass sich humane hämatopoetische Vorläuferzellen in Anwesenheit von IL-15 in CD56^{bright} ähnliche Zellen differenzieren lassen, welche Zytokine sezernieren und Zielzellen lysieren können [113, 114]. In Kokultivierungsversuchen von CD56^{bright} NK-Zellen mit synovialen Fibroblasten konnte die Differenzierung in CD56^{dim} NK-Zellen beobachtet werden, welche außerdem durch die Blockierung des CD56 Liganden FGFR1 (engl.: *Fibroblast growth factor receptor*) inhibiert werden konnte. Außerdem wurde gezeigt, dass CD56^{dim} NK-Zellen kürzere Telomere aufweisen als CD56^{bright} NK-Zellen aus dem Blut oder Lymphknoten, was darauf hindeutet, dass CD56^{dim} Zellen mehr Zellteilungen absolviert haben und daher im Entwicklungsprozess nach den CD56^{bright} Zellen folgen. In der gleichen Studie konnte beobachtet werden, dass CD56^{bright} Zellen aus dem Lymphknoten und der Peripherie in der Lage sind, Moleküle der CD56^{dim} NK-Zellen (CD16, Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren) zu exprimieren, sofern der Lymphknoten, in dem sie sich befinden, reaktiv ist [112]. Diese Ergebnisse bestätigen andere Beobachtungen an CD56^{bright} NK-Zellen aus dem Lymphknoten und der Mandeln, die nach einwöchiger IL-2-Stimulation, KIR Rezeptoren und CD16 exprimieren [115].

Neben CD56 und CD16 wurde in dieser Arbeit der *Scavenger*-Rezeptor CD6 als neuer differenzieller NK-Zell-Marker untersucht (Abschnitt E.1, Seite 54), der bislang ausschließlich auf T-Zellen beschrieben wurde. So exprimieren die meisten CD56^{dim} NK-Zellen CD6 auf

ihrer Oberfläche, wohingegen CD56^{bright} Zellen CD6⁻ sind, auch wenn sie CD16 exprimieren (Abbildung 12, Seite 55). Synoviale NK-Zellen exprimieren ebenfalls kein CD6, womit die Abwesenheit von CD6 im Vergleich zu >20 NK-Rezeptoren am stärksten mit dem SF-assoziierten Phänotyp korreliert. Daher kann die Abwesenheit von CD6 eindeutiger als CD16 und CD56 mit der Infiltration der CD56^{bright} NK-Zellen in die SF korreliert werden.

Interessant ist, dass, im Gegensatz zu NK-Zellen, die Anzahl der CD6⁺ T-Zellen in der SF unverändert ist, was mit der Beobachtung einhergeht, dass NK-Zellen ein anderes Zytokinmuster nach Stimulation des CD6 Rezeptors aufweisen als T-Zellen (Abbildung 22, Seite 79).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der CD6 Rezeptor auf NK-Zellen einer anderen Regulation unterliegt als auf T-Lymphozyten und damit einen spezifischen Infiltrationsmarker für NK-Zellen in die SF, unabhängig von der Primärerkrankung, darstellt (vgl. Arthritis und Arthrose).

Einen weiteren Unterschied zwischen NK- und T-Zellen im Hinblick auf die CD6 Expression belegt die Analyse der CD6 Splicevarianten. In T-Lymphozyten wurden bereits Anfang der 90er Jahre verschiedene CD6 mRNS Splicevarianten beschrieben, denen intrazelluläre Domänen fehlen (CD6 Δ Ex8, CD6 Δ Ex8+9, CD6 Δ Ex8+12, CD6 Δ Ex9+12) [61]. Castro et.al. beschrieb eine weitere Isoform, der durch die Abwesenheit von Exon 5 (CD6 Δ d3) die SRCR3 Domäne und damit die ALCAM Bindestelle fehlt. Er beschrieb weiterhin, dass diese Splicevariante das Gesamt-CD6-Transkript, nach Aktivierung von T-Zellen, größtenteils ersetzt. Während der Antigenpräsentation in der immunologischen Synapse zwischen T-Zellen und APC ist diese Splicevariante, anders als das Gesamt-CD6-Molekül, kaum noch zu finden [96]. Analog zu T-Zellen wurde die CD6 Δ d3-Splicevarianten in der vorliegenden Arbeit auch in der NKL-Zelllinie und in primären NK-Zellen gefunden (Abbildung 14 und Abbildung 15, Seite 60, 61). Allerdings trat diese vor allem in unstimulierten Zellen auf und ging ebenso wenig mit einer Abnahme des Gesamt-Transkripts einher. Vielmehr konnte in primären NK-Zellen kein CD6-Gesamttranskript amplifiziert werden, obwohl dies in NKL-Zellen möglich war. Da NKL konstitutiv aktivierte Leukämie-Zellen sind ist es durchaus möglich, dass diese ein anderes Splicemuster aufweisen als primäre NK-Zellen aus dem Blut gesunder Spender.

Das Auftreten von verschiedenen funktionellen CD6-Splicevariante, sowie die Unterschiede in der CD6-Editierung zwischen NK- und T-Zellen sind von großem Interesse, da sie möglicherweise einen eleganten Mechanismus zur Regulation des Migrationsverhaltens von NK-Zellen darstellen könnten. Welche Signaltransduktionswege, durch die Stimulation des CD6-Rezeptors auf NK-Zellen im Vergleich zu T-Zellen aktiviert werden, ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Neben dem Fehlen von CD6 belegt die Expression weiterer Marker den stabilen Phänotyp der CD56^{bright} NK-Zellen. So ist das Heterodimer CD94/NKG2A, aber auch andere Marker wie Nkp46, vor allem auf CD56^{bright} NK-Zellen exprimiert wie FACS-Analysen der NK-Zellen aus dem Blut von gesunden Spendern sowie von den Patienten zeigen (Abbildung 13, Abbildung 24, Seite 58 bzw. 84). CD94 bildet außer mit dem inhibierenden Rezeptor NKG2A auch mit dem aktivierenden Rezeptor NKG2C Heterodimere. Da zu Beginn dieser Arbeit leider kein direkter Nachweis von NKG2C möglich war, konnte dessen Expression auf synovialen NK- und T-Zellen nicht untersucht werden.

Ein wichtiger aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen ist NKG2D. In der Peripherie von gesunden Spendern wird NKG2D von beiden NK-Subpopulationen in nahezu gleicher Weise exprimiert. Anders ist dies in der Peripherie der Arthritis-Patienten, da hier deutlich weniger CD56^{dim} NK-Zellen NKG2D exprimieren als CD56^{bright} NK-Zellen (Abbildung 26/C, Seite 89). Noch weniger NKG2D⁺ NK-Zellen liegen in der Synovialflüssigkeit der Arthritis-Patienten vor. Verschiedene Studien konnten allerdings zeigen, dass NKG2D auf NK- und T-Zellen durch IFN- γ oder durch den permanenten Kontakt mit seinen MIC-Liganden (MICA/B, ULBP1-6) herunter reguliert wird. [116-118]. Wie in Abbildung 31 (Seite 101) gezeigt, ist die IFN- γ Konzentration in den SF der Arthritis-Patienten tatsächlich erhöht. Außerdem belegen andere Arbeitsgruppen eine erhöhte Konzentration an löslichem MICA und MICB sowie die verstärkte Expression dieser NKG2D Liganden auf Synoviozyten [117, 119]. Auch in meinem Patientenkollektiv konnte eine signifikant erhöhte MICA/B-Konzentration in den SF der Arthritis-Patienten, gegenüber den autologen Plasmen und den SF/Plasmen der Arthrose-Patienten, nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auf den hier untersuchten T-Zellen kann dieses Phänomen der NKG2D-Modulation jedoch nicht beobachtet werden (Abbildung 26/D, Seite 89). Obwohl die Expression von NKG2D bisher ausschließlich für CD8⁺ T-Zellen gezeigt wurde, beschrieben Groh *et.al.* in Patienten mit Arthritis eine Anreicherung von NKG2D⁺CD4⁺ T-Zellen, welche sich in Anwesenheit von IL-15 und TNF- α bilden [117]. Da in dieser Arbeit keine Unterscheidung zwischen CD4 und CD8 T-Zellen vorgenommen wurde, kann hier keine Aussage über eine eventuelle Abnahme von NKG2D auf T-Zellen getroffen werden. Zusammen zeigen diese Beobachtungen, dass die Abnahme von NKG2D auf synovialen NK-Zellen durch äußere Einflüsse (z.B. Zytokine, lösliche Liganden) bedingt ist. Obwohl CD56^{bright} NK-Zellen in der SF ein invertiertes Verteilungsmuster zur Peripherie aufweisen, gilt dies nicht für die Synovialmembran. Hier bilden die CD56^{dim}CD6⁺ NK-Zellen nach wie vor die Hauptpopulation (Abbildung 27, Seite 95). Dies führt zu der Vermutung, dass die Synovialmembran eine Art Barriere für die CD6⁺CD56^{dim} NK-Zellen, nicht aber für CD6⁺ T-Zellen darstellt. Eine Möglichkeit könnte eine blockierende Interaktion zwischen den

ALCAM exprimierenden synovialen Fibroblasten (eigene Beobachtungen, nicht gezeigt) und dem CD6 der CD56^{dim} NK-Zellen darstellen.

ALCAM ist ein Adhäsionsmolekül, das u.a. auf Knochenmarks-Stromazellen, Thymus-Epithelzellen, Synovia-Fibroblasten, Keratinozyten, Mesangialzellen und Endothelzellen exprimiert wird [120] und dessen Expression in Anwesenheit von IFN- γ verstärkt wird [121]. In einem Mausmodell mit MOG-induzierter Enzephalitis sowie an humanen Gehirnläsionen von Patienten mit Multipler Sklerose konnte gezeigt werden, dass die Blockierung von ALCAM zu einem Ausschluss der CD4⁺, nicht aber der CD8⁺ T-Zellen durch die Blut-Hirnschranke führt [121]. Die unterschiedlichen Signaleigenschaften des CD6 Rezeptors auf T- und NK-Zellen könnte auch dahin führen, dass die Migration, durch die CD6-Ligand-Interaktion unterschiedlich beeinflusst wird. Welche Bedeutung die CD6/ALCAM-Interaktion auf das Migrationsverhalten von NK-Zellen im Vergleich zu den differenziell exprimierten Chemokinrezeptoren CXCR1, CXCR3, CCR7 hat, soll in weiterführenden Migrations-Experimenten mit Hilfe von ALCAM positiven synovialen Fibroblasten, ALCAM-knock-down-Fibroblasten sowie löslichen ALCAM-Fc-Fusionsproteinen untersucht werden. Ein weiterer Ligand für CD6 ist das 3A11-Antigen, welches auf einer Reihe von Epithel- und Mesenchymal-Zellen lokalisiert ist und dessen Expression, wie ALCAM, durch IFN- γ erhöht werden kann. Allerdings konnte diesem Molekül bisher keine weitere Funktion zugeordnet werden [64].

Eigene Migrationsversuche, in denen Zellen aktiv durch eine Membran zu einem Chemokin wandern, belegen die Migrationsbereitschaft von CD56^{dim}CD6⁺CXCR4⁺, nicht aber von CD56^{dim}CD6⁻CXCR4⁺ NK-Zellen in Anwesenheit entsprechender Chemokine wie CXCL12 (SDF-1 α) (Abbildung 34, Seite 110). Dies deutet auf einen Einfluss der synovialen Fibroblasten, welche die Synovialmembran auskleiden, hin, die durch unbekannte inhibierende Signale die CD6⁺ NK-Zellen an der Migration hindern.

Die Dominanz der CD56^{bright} NK-Zellen in der SF beruht nicht ausschließlich auf dem inflammatorischen Milieu des Synoviums. Interessanterweise ist kein Unterschied in der SF-Rekrutierung der CD56^{bright} NK-Zellen zwischen Arthritis- und Arthrose-Patienten zu sehen, was bedeutet, dass ein fulminantes autoimmunes Geschehen nicht für diese selektive Infiltration notwendig ist. Dies wird unterstützt durch eigene Beobachtungen in Tonsillen, gesundem Lebergewebe (Doktorarbeit Christian Quack) sowie in Synovialgewebe von Arthrose-Patienten. Dennoch verdeutlicht die hohe Anzahl immunologisch wirksamer Zellen in dem entzündlichen Milieu der Synovialflüssigkeit eine starke migratorisch wirkende Kraft von Chemokinen, die zumindest teilweise eine Erklärung für die Dominanz der CD56^{bright} NK-Zellen in der SF oder anderen gesunden Geweben bieten. So ist anzunehmen, dass CD56^{bright} NK-Zellen aufgrund ihres spezifischen Chemokinrezeptor-Repertoires entsprechend einem Gradienten in die Synovialflüssigkeit migrieren.

Campbell *et.al.* beschrieben ein jeweils einzigartiges Spektrum von Chemokinrezeptoren auf CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zellen, welches in dieser Arbeit bestätigt werden konnte [72, 122]. So exprimieren CD56^{bright} Zellen den CXCR3-Rezeptor, der die Liganden CXCL9 und CXCL10 (MIG und IP-10) bindet, in höherer Konzentration als CD56^{dim} NK-Zellen. Diese wiederum exprimieren nahezu exklusiv CXCR1 und CXCR2, die Rezeptoren für CXCL1 und CXCL8 (GRO- α und IL-8, CXCR2 bindet zusätzlich CXCL2, 3, 5 und 7). CCR5, ein Rezeptor für CCL3-6 (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-2), CCL11, 14 und 16 wird dagegen von beiden Populationen, jedoch stärker von den CD56^{bright} NK-Zellen, exprimiert (Abbildung 32, Seite 106). In der Literatur wird zudem der CD56^{bright} Subpopulation eine verstärkte Expression des Lymphknoten „*homing*“ Rezeptors CCR7 zugeschrieben [71]. Obwohl im Vergleich zu den ebenfalls untersuchten T-Zellen nur eine schwache CCR7 Expression auf den NK-Zellen detektiert wurde, konnten die Ergebnisse aus der Literatur bestätigt werden. Dalbeth et. al. vermuteten, dass eine erhöhte Konzentration von CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) und CCL5 (RANTES) mit der selektiven Infiltration der CD56^{bright}CCR5⁺ NK-Zellen in die SF korreliert [101]. Die Analyse der Chemokine in den SF und Plasmen der Patienten mit Arthrose und Arthritis zeigt tatsächlich eine signifikant höhere Konzentration von CCL4 in den SF, verglichen mit den autologen Plasmen der Arthritis-Patienten. Innerhalb der Arthrose-Patienten ist der Unterschied jedoch nicht signifikant. Allerdings ist die Konzentration der anderen Liganden CCL5, CCL3 und CCL11 signifikant niedriger in den SF beider Patientengruppen, verglichen mit den Plasmaspiegeln (Abbildung 33, Seite 108). Da einige CD56^{dim} NK-Zellen ebenso den CCR5 Rezeptor exprimieren, ist dieser Chemokinrezeptor möglicherweise nicht geeignet, um eine mögliche chemokingerichtete Anreicherung der CD56^{bright} NK-Zellen zu erklären. Ein Rezeptor, der hingegen am stärksten von den CD56^{bright} NK-Zellen exprimiert wird, ist CXCR3. In den SF beider Patienten sind die CXCR3 bindenden Chemokine CXCL10 (IP-10) und CXCL9 (MIG) auch in signifikant höherer Konzentration vorhanden als in den autologen Plasmen. Die Liganden CXCL8 und CXCL1 der CD56^{dim} restringierten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 sind in den SF der Arthritis- und Arthrose-Patienten ebenfalls signifikant erhöht, obwohl nur wenige dieser Zellen dort zu finden sind. Das unterschiedliche chemotaktische Verhalten von CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen zu demselben Chemokin konnte in Migrationsversuchen ebenfalls bestätigt werden (Abbildung 34, Seite 113). Bietet man den Zellen Chemokine wie CXCL10 oder CCL5 als Lockstoff an, migrieren fast ausschließlich die CD56^{bright}CD6⁻ NK-Zellen, worin sich ebenfalls die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 widerspiegelt. Dagegen konnte weder CXCL8 noch CXCL1 die Migration von CXCR1 und CXCR2 exprimierenden CD56^{dim} NK-Zellen auslösen. In der Literatur wird die Migration von CD56^{dim} NK-Zellen auf diese Chemokine hin kontrovers diskutiert. Einige Studien belegen die CXCL1 und CXCL8 [72, 73] vermittelte Migration von ruhenden CD56^{dim} NK-Zellen und andere

beschreiben widersprüchliche Ergebnisse, die sie auf donorspezifische Effekte zurückführen [74]. Die Chemokinrezeptoranalyse der jeweiligen NK-Subpopulationen aus der Literatur ist oft widersprüchlich, was möglicherweise auf die Verwendung unterschiedlicher Färbeprotokolle bzw. Antikörper oder Zellseparationstechniken zurück zu führen ist [122]. Obwohl die FACS-Analyse in Abbildung 32 (Seite 106) darauf hindeutet, dass eher die $CD56^{dim}$ NK-Zellen CXCR4 exprimieren, beschreiben andere Gruppen die Expression vor allem auf $CD56^{bright}$ NK Zellen [123], welche wiederum mit der stärkeren Migration der $CD56^{bright}CD6^{-}$ NK-Zellen zu CXCL12 einher geht (Abbildung 34, Seite 110).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass allein die synovialen Chemokine nicht der Grund für die Dominanz der synovialen $CD56^{bright}$ bzw. die Abwesenheit der $CD6^{+}CD56^{dim}$ NK-Zellen darstellen, aber dennoch eine starke treibende Kraft bilden, die ein mögliches inhibierendes Signal (z.B. Blockade durch die $CD6$ -ALCAM Interaktion) nicht überwinden kann.

2.2 Differenzielle Zytokin/Chemokin-Muster in der Synovialflüssigkeit von Arthritis- und Arthrose-Patienten

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronisch Autoimmunerkrankung, die durch eine starke Entzündung im gesamten Synovium und der daraus resultierenden Gelenkdegeneration durch Knorpel- und Knochenabbau gekennzeichnet ist [124]. Das entzündliche Milieu der Synovialflüssigkeit trägt zu einer starken Akkumulation von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems wie Makrophagen, DC, Plasmazellen, neutrophile Granulozyten, T-, B-Lymphozyten und NK-Zellen ($CD56^{bright}CD6^{-}$) bei, die, ebenso wie synoviale Zellen (z.B. synoviale Fibroblasten), durch die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen das stark inflammatorische Milieu in der Synovium aufrecht erhalten.



Abbildung 35: Überblick über die Zytokin vermittelten Regulationen in der Synovialflüssigkeit der rheumatoiden Arthritis.

Dargestellt sind synoviale Zellen des adaptiven (erworbenen) und des angeborenen Immunsystems mit deren Zytokin vermittelten Interaktionen. In das Bild wurden die NK-Zellen, aufgrund ihrer Fähigkeit Zytokine und Chemokine zu sezernieren, integriert. Abbildung modifiziert nach [58].

NK- und T-Zellen sind Hauptproduzenten von IFN- γ , welchem durch sein starkes Makrophagen-Aktivierungs-Potential traditionell eine entscheidende Rolle in der RA zugeschrieben wird. In neuerer Zeit häufen sich allerdings die Beobachtungen, welche diesem Zytokin eine eher untergeordnete Stellung im Kontext der rheumatoiden Arthritis (RA) zuweisen [125]. So konnten Untersuchungen an Mäusen zeigen, dass IFN- γ die Differenzierung der proinflammatorischen Th17-Zellen [45] sowie die Osteoklastogenese [126] unterdrückt. Außerdem beschrieben klinische Studien mit rekombinantem IFN- γ weder eine Verbesserung noch eine Verschlechterung der Krankheitssymptome bei Patienten mit Arthritis [127]. Diese Befunde unterstreichen die Komplexität des entzündlichen Geschehens und damit die Annahme, dass eine fulminante autoimmune Entzündung nicht allein durch ein Zytokin oder Chemokin, sondern durch ein Konzert an kooperierenden Faktoren bedingt ist. Daher ist es nicht verwunderlich, dass sich in den hier untersuchten Proben eine erhöhte Konzentration von IFN- γ in den SF und Plasmen der Arthritis-Patienten sowie in den Plasmen, nicht aber in den SF der Arthrose-Patienten zeigt. Diese Verteilung ist bei einer Reihe weiterer Faktoren zu beobachten. Neben IFN- γ gehört auch TNF- α zu den Th1-Zytokinen, welches synoviale Fibroblasten stimuliert, die dadurch vermehrt proliferieren und Zytokine/Chemokine wie IL-6, IL-1 und CXCL8 sezernieren [58, 128]. Diese aktivieren

wiederum die Zytokinproduktion von Makrophagen, wodurch ein positiver Feedback-Mechanismus zwischen Makrophagen und synovialen Fibroblasten entsteht, der eine fortwährende Gelenkzerstörung zur Folge hat. Im Vergleich zu den SF der Arthrose-Patienten ist die Konzentration von TNF- α , IL6 und CXCL8 in den der Arthritis-Patienten signifikant erhöht. So verwundert es nicht, dass sich die therapeutische Blockierung von TNF- α (Adalimumab = anti-TNF- α Antikörper, Etanercept = rekombinanter TNF- α R), IL-1 (Anakinra = IL-1 Antagonist) und IL-6 (Tocilizumab = IL-6R Antikörper) als sehr erfolgreich in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis erwiesen haben, was wiederum die wichtige klinische Bedeutung dieser Zytokine belegt [129].

Neben TNF- α wurden zwei weitere Mitglieder der TNF-Superfamilie untersucht: TRAIL (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) und TNF- β (Lymphotoxin α). Interessanterweise beschrieben Untersuchungen an DBA/1 Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis eine inhibierende Wirkung von TRAIL in diesem Mausmodell. So führte die Blockierung von TRAIL zu einer Hyperproliferation von synovialen Zellen und einer erhöhten Konzentration von Autoantikörpern [130]. Ebenso konnte eine TRAIL vermittelte Inhibition der RANKL und M-CSF induzierten Osteoklastendifferenzierung gezeigt werden [131]. Weiterhin fördern die beiden Zytokine TNF- α und IL-1 β die TRAIL Expression von rheumatoiden synovialen Fibroblasten [132]. Da beide Zytokine in der SF von Arthritis-Patienten angereichert vorliegen, erklärt dies die erhöhte Konzentration dieses proapoptotischen Moleküls [130].

TNF- β , das an der Ausbildung sog. Tertiärer lymphoider Strukturen beteiligt ist, zeigt sich hingegen in deutlich geringerer Konzentration in den SF und Plasmen beider Patientengruppen, als TNF- α . Dennoch ist die Konzentration in den untersuchten Proben der Arthritis-Patienten signifikant höher als in denen der Arthrose-Patienten. Bisher wurde diesem Zytokin, anders als dem äußerst homologen TNF- α , im Kontext der rheumatoiden Arthritis wenig Beachtung geschenkt. Jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass TNF- β die Proliferation und Zytokinsekretion synovialer Fibroblasten stimuliert [133]. Ferner geben Fallstudien, in denen Patienten beschrieben werden, die nicht auf den TNF- α spezifischen Antikörper Infliximab, aber auf das TNF- α/β bindende Fc-Fusionsprotein Etanercept ansprechen, einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Rolle von TNF- β in der rheumatoiden Arthritis [134, 135].

Die Th2 Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13, weisen in allen untersuchten Kompartimenten eine geringe Konzentration auf. Obwohl eine erhöhte Konzentration im Plasma, nicht aber in den SF, von Patienten mit Arthritis publiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass nach therapeutischer Behandlung mit dem anti-TNF- α/β Antikörper Etanercept die Konzentration von IL-13 im Plasma der Patienten mit Arthritis abnimmt [136]. Die medikamentöse Behandlung des hier untersuchten RA-Patientenkollektivs ist im Einzelnen nicht bekannt; da

innerhalb der untersuchten Plasmen der Arthritis-Patienten einige Proben eine hohe Konzentration von IL-13 aufweisen, ist es vorstellbar, dass diese Patienten keine TNF-Antagonisten Therapie erhalten haben.

Es wurde gezeigt das Osteoblasten IL-18 freisetzen, welches T-Lymphozyten zur GM-CSF Bildung anregt und damit indirekt die Differenzierung von Osteoklasten (Knochenabbauenden Zellen) aus hämatopoetischen Stammzellen verhindert [137]. Allerdings ist die Konzentration von GM-CSF in den SF beider Patienten niedriger als in den jeweiligen autologen Plasmen (Abbildung 31 und Abbildung 32, Seite 101 und 106), was darauf hindeutet, dass dieses Zytokin in der rheumatischen Knochenerosion eine untergeordnete Rolle spielt.

Die parallele Analyse von 50 Zytokinen und Chemokinen in den SF von Arthritis- und Arthrose-Patienten (nicht alle gezeigt) ermöglicht es das jeweilige Szenario, sowie die Unterschiede zwischen den beiden Entzündungsprozessen deutlich hervorzuheben.

So sind in den SF der Arthritis-Patienten die IFN- γ , IL-2, TNF- α , TNF- β , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22, TRAIL, IL-6, CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL11 (EOTAXIN), CXCL1 (GRO- α), CXCL8 (IL-8), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1 α) Faktoren signifikant erhöht: Mit dieser Auswahl an Faktoren lässt sich deutlich demaskieren, dass in beiden Entzündungen die pathologische Endstrecke der Abbau von Knorpel- und Knochengewebe ist, sich die Wege dorthin jedoch deutlich unterscheiden. In der rheumatoiden Arthritis führen sie über den autoimmunen Weg und dessen Mediatoren IFN- γ , IL-1, IL-2, TNF- α/β , IL17, IL-22 und IL-6. Dagegen fehlen diese Faktoren (IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-22) in den SF der Arthrose-Patienten komplett, oder sind im Vergleich zu den SF der Arthritiden signifikant reduziert (TNF- α , TNF- β , IL-22, IL6). Ohne die klassischen proinflammatorischen Faktoren erfolgt die finale Gewebszerstörung über M-CSF, RANKL und Chemokine, welche bei den Arthrosen die destruktiven Prozesse induzieren.

Leukozyteninfiltration: selektive CD56^{bright} Anreicherung in SF der Arthritiden UND Arthrosen

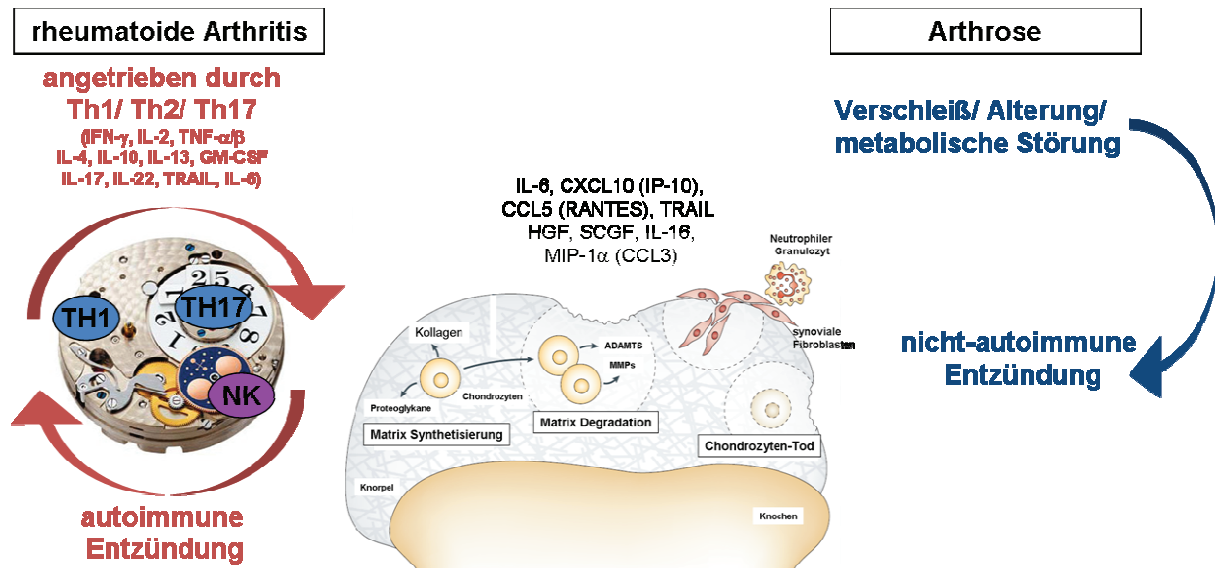


Abbildung 36: Schematische Darstellung über die Hypothese der autoimmunen und nicht autoimmunen Gelenkentzündung.

In der SF der Arthrosen und Arthritiden liegt die gleiche selektive Anreicherung der CD56^{bright} NK-Zellen vor. Obwohl beide Erkrankungen eine Destruktion des Knochen- und Knorpelgewebes zur Folge haben, führen unterschiedliche Wege zu dieser Zerstörung. Bei den Arthritiden findet, im Gegensatz zu den Arthrosen, eine Th1, Th2 und Th17-vermittelte Immunreaktion statt, welche autoimmunen Ursprungs ist und sich durch positive Rückkopplungseffekte selbst aufrecht erhält. Dadurch kommt es zu einer starken chronischen Entzündung, in deren Folge Chondrozyten und Osteoklasten aktiviert werden. Dagegen liegt den Arthrosen kein autoimmuner Ursprung zugrunde. Hier führen mechanischer Verschleiß und Stoffwechselstörungen, nicht aber Th1, Th2 oder Th17-Zytokine zu einem altersbedingten Knorpel- und Knochenabbau, der letztlich zu einer Entzündung in den betroffenen Gelenken führt.

2.3 Der Einfluss von NK- und T-Zellen an der Aufrechterhaltung des inflammatorischen Milieus in der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten

Zytokine und Chemokine spielen in der Entstehung und im Verlauf der rheumatoiden Arthritis eine entscheidende Rolle. NK- und T-Zellen tragen, neben vielen anderen Zellen, an der Aufrechterhaltung dieses inflammatorischen Milieus bei. Eine wichtige Frage war es daher, welche Zytokine/Chemokine synoviale NK-Zellen nach Rezeptoraktivierung sezernieren können.

Aufgrund des geringen Probenvolumens war es allerdings nicht möglich, NK- und T-Zellen in ausreichender Qualität und Quantität aus der Synovialflüssigkeit, vor allem der Arthrose-Patienten, zu isolieren, um eine zellspezifische Analyse durchführen zu können.

Untersuchungen an NK-Zellen aus dem Blut von gesunden Spendern zeigten aber, dass die Stimulation der NK-Zell-spezifischen Rezeptoren NKp46 oder NKp30 zu einer Freisetzung verschiedener Chemokine und Zytokine führt. Andere Rezeptoren wie NKG2C, NKG2D oder

CD16, die zwar hauptsächlich von NK-Zellen exprimiert werden, jedoch auch auf einer geringen Anzahl an T-Zellen bzw. Monozyten zu finden sind (Abbildung 12, Seite 55), können gleichfalls die Chemokin/Zytokin Sekretion der NK-Zellen vermitteln (CD16 siehe Abbildung 20, Seite 74). Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit auch die CD6-vermittelte Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen belegt (Abbildung 20, Seite 74). Da synoviale CD56^{bright} NK-Zellen jedoch kein CD6 exprimieren (Abbildung 24, Seite 84), unterlag eine CD6 vermittelte Zytokin Freisetzung eher den synovialen CD6+ T-Zellen.

Nach 48h Stimulation von SFMC in Anwesenheit von IL-2 war die Konzentration von CXCL8 so hoch, dass sie außerhalb des linearen Messbereichs lag (Abbildung 28, Seite 95). Da die CXCL8 Spiegel in den SF beider Patienten aber ebenfalls erhöht sind, deutet dies möglicherweise auf eine positive Rückkopplung hin, wonach die CXCL8 Produktion von der Zunahme anderer Zytokine und Chemokine, wie sie innerhalb der 48 Stunden Stimulation stattfand, stimuliert wird. Dieser Vermutung lässt sich ebenfalls auf die Chemokine CCL4, CXCL9 und CXCL10 übertragen, deren hohe Expression in den SF von Arthritis-Patienten bereits mehrfach beschrieben und hier bestätigt werden konnte [138, 139]. Mononukleäre Zellen aus dem Blut der Arthritis Patienten wurden ebenfalls untersucht. Anders als bei den SFMC, konnte diese starke Chemokinausschüttung in peripheren PBMC nicht beobachtet werden. Aufgrund der stark entzündlichen Umgebung, aus der die SFMC isoliert wurden, ist davon auszugehen, dass diese Zellen, anders als die autologen PBMC, bereits aktiviert vorlagen und daher schneller größere Mengen Zytokine freisetzen konnten, was auf einen Memory-Status hindeutet. Dies spiegelt sich auf einem niedrigeren Niveau auch bei anderen hier untersuchten Chemokinen wieder.

NKp46, aber auch NKp30, sind Rezeptoren, die ausschließlich von NK-Zellen exprimiert werden. Trotzdem kann hier, vor allem nach Stimulation des NKp46 Rezeptors, davon ausgegangen werden, dass die im Kulturüberstand gemessenen Zytokine und Chemokine von NK-Zellen sezerniert wurde (Abbildung 28, Seite 95).

Obwohl synoviale NK-Zellen nach Stimulation beider Rezeptoren sowohl Zytokine als auch Chemokine freisetzen, fällt auf, dass NKp30 vor allem die Freisetzung der Chemokine (CCL3, CCL4, CCL5 und CXCL1) auslöst und NKp46 eher die der Zytokine (GM-CSF, IL-17, IL-13, TNF- α/β und TRAIL). Eine solche Aufgabenteilung zwischen den beiden Rezeptoren ist vorstellbar, da die bisher beschriebenen Liganden für NKp30 tumorassoziiert sind (B7-H6 und BAT3) und als Liganden für NKp46 unterschiedliche virale Hämagglutinine beschrieben wurden [140]. Allerdings verändert sich das Muster bei manchen Zytokin/Chemokin nach NKp30- oder NKp46-Stimulation der korrespondierenden peripheren NK-Zellen. Am deutlichsten fällt dies bei IFN- γ auf. So lag die Konzentration dieses Zytokins nach Stimulation der synovialen NK-Zellen mit NKp30 über der bei NKp46, was bei gesunden Spendern nicht beobachtet werden kann (Daten nicht gezeigt). Innerhalb der peripheren NK-

Zellen scheint es hingegen so, als ob NKp30 keine IFN- γ Freisetzung vermitteln kann. Wie die Stimulationen anderer Spender SFMC oder PBMC zeigen konnten ist dies jedoch nicht der Fall (Anhang, Abbildung 38, Seite 145).

NKG2C und NKG2D werden ebenfalls von den meisten NK-Zellen, aber auch von einer T-Zell-Minderheit exprimiert. Es scheint zunächst so, als ob vor allem durch Aktivierung von NKG2D und weniger von NKG2C, Zytokine und Chemokine, wie CXCL1 oder IL-17, in freigesetzt werden können. Allerdings exprimieren T-Zellen deutlich mehr NKG2D als NKG2C und erhöhen daher zusammen mit NK-Zellen den Zytokin/Chemokin Spiegel. Ähnlich verhält es sich mit CD16. Dieser Rezeptor wird ebenso von NK-Zellen wie auch von Monozyten und NKT Zellen exprimiert. Die Stimulation dieses Rezeptors vermittelt den Ausstoß der Chemokine CXCL1, CCL5, CXCL12 und die Zytokine IFN- γ , IL-17, TNF- α/β , TRAIL in den Kulturüberstand und somit wohl auch in die Synovialflüssigkeit.

Durch die Stimulation der SFMC durch CD3 zeigte sich, dass die T-Zellen potente Chemokin- und Zytokin-Produzenten sind. Interessanterweise konnten auch nach Stimulation des CD6 Rezeptors Chemokine und Zytokine abgegeben werden.

Anhand dieser Versuche bestätigt sich, dass T- und NK-Zellen an der Aufrechterhaltung des inflammatorischen Milieus beteiligt sind. Darüber hinaus konnte hier gezeigt werden, dass auch NK-Zellen, wie die IL-17 produzierenden T-Zellen, in das Bild der Th17-Immunantwort zu integrieren sind.

2.4 IL-17 und IL-22 produzierende NK-Zellen

Ein Zytokin, dass in den letzten Jahren im Bereich der Autoimmunkrankheiten zunehmend an Bedeutung gewonnen hat, ist IL-17 [141] (weitere Quellen: 47, 53, 59, 60, 71, 81). Im Vergleich zu anderen Zytokinen wie TNF- α , ist IL-17 in den SF eher in geringerer Konzentration vorhanden, jedoch unterstreicht die Abwesenheit dieses Zytokins in der Kontrollgruppe der Arthrose-Patienten, seine wichtige Funktion in der rheumatoiden Arthritis (Abbildung 31, Seite 101). IL-17 induziert in IL-17-Rezeptor exprimierenden Zielzellen (z.B. Fibroblasten, Monozyten) die Expression unterschiedlicher Zytokine wie GM-CSF, CXCL8 und IL-6 und bewirkt damit neben einer verstärkten Granulopoese oder Osteoklastogenese auch die Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [68]. Als Quelle für IL-17A und -F wurden bisher ausschließlich T-Zellen beschrieben. Neben IL-17, IL-6, GM-CSF und TNF- α produzieren die Th17-Zellen auch IL-22. Synoviale Fibroblasten und Makrophagen sezernieren neben den Th17-Zellen ebenfalls IL-22, welches wiederum autokrin in den synovialen Fibroblasten Proliferation auslöst und die Ausschüttung des Makrophagen rekrutierenden Chemokins CCL2 (MCP-1) vermittelt [142, 143].

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass rezeptorstimulierte NK-Zellen ebenfalls IL-17 produzieren können. In Abbildung 20 (Seite 74) ist die IL-17 Produktion von separierten NK-

Zellen eines gesunden Spenders nach 24 Stunden Stimulation der CD6 und CD16 Rezeptoren gezeigt, die über die Zeit andauert und zu einer Akkumulation dieses Zytokins im Kulturüberstand führt (Abbildung 21, Seite 77). Neben diesen Rezeptoren führt die Stimulation anderer Rezeptoren (z.B. NKp46) ebenfalls zur IL-17 Sekretion. Nach unspezifischer Stimulation frischer NK- und T-Zellen, gesunder Spender, mit PMA und Ionomycin konnte in T-Zellen, nicht aber in NK-Zellen, intrazelluläres IL-17 und IL-22 nachgewiesen werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass NK-Zellen nur nach Rezeptorstimulation, unterstützt durch die Anwesenheit von weiteren stimulierenden Zytokinen, in der Lage sind, IL-17 bzw. IL-22 zu produzieren. Da die Stimulation mit PMA/Ionomycin jedoch nur 4 Stunden andauert, ist dies kein zuverlässiger Beleg. Jedoch ist es vorstellbar, dass CD6⁺CD56^{dim} NK-Zellen nach Kontakt mit den ALCAM produzierenden synovialen Fibroblasten IL-17 produzieren, die diese, in Anwesenheit von IL-1b und TNF- α , wiederum aktivieren und zur Produktion von Zytokinen (IL-1, 6, GM-CSF) und Chemokinen (CCL2 und CCL5) anregen, womit weitere Immunzellen rekrutiert werden [144].

Im Gegensatz zu peripheren NK-Zellen kann in synoviale NK-Zellen bereits nach 6 Stunden in Anwesenheit von PMA und Ionomycin IL-17 und IL-22 nachgewiesen werden. Da die NK-Zellen aus einem hoch inflammatorischen Milieu (SF) isoliert wurden, ist hier davon auszugehen, dass diese durch die Anwesenheit vieler Zytokine/Chemokine und Liganden (e.g. Autoantikörper) bereits voraktiviert waren (Abbildung 29 und Abbildung 30, Seite 98, 99). Damit zeigt sich, dass NK-Zellen ebenfalls in die IL-17 vermittelte Immunantwort zu integrieren sind wie die Th17-Zellen.

Obwohl NK-Zellen ein kleines Rädchen im Immunsystem darstellen, haben sie jedoch, durch die Freisetzung großer Mengen an Zytokinen und Chemokinen, einen beträchtlichen Einfluss auf die Modulation dieser komplexen Maschinerie.

A. Literatur

1. Sun, J.C., J.N. Beilke, and L.L. Lanier, *Adaptive immune features of natural killer cells*. Nature, 2009. **457**(7229): p. 557-61.
2. Waggoner, S.N., et al., *Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 394-8.
3. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell, *"Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype*. Eur J Immunol, 1975. **5**(2): p. 112-7.
4. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. Blood, 2008. **112**(3): p. 461-9.
5. Trapani, J.A. and M.J. Smyth, *Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 735-47.
6. Smyth, M.J., et al., *Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(1): p. 18-29.
7. Karre, K., et al., *Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy*. Nature, 1986. **319**(6055): p. 675-8.
8. Kumar, V. and M.E. McNerney, *A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 363-74.
9. Zimmer, J., et al., *Activity and phenotype of natural killer cells in peptide transporter (TAP)-deficient patients (type I bare lymphocyte syndrome)*. J Exp Med, 1998. **187**(1): p. 117-22.
10. Kim, S., et al., *Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 709-13.
11. Raulet, D.H. and R.E. Vance, *Self-tolerance of natural killer cells*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 520-31.
12. Brodin, P., K. Karre, and P. Hoglund, *NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat*. Trends Immunol, 2009. **30**(4): p. 143-9.
13. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3146-51.
14. Bjorkstrom, N.K., et al., *Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus*. J Exp Med, 2011. **208**(1): p. 13-21.
15. Lopez-Verges, S., et al., *Expansion of a unique CD57NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(36): p. 14725-32.
16. Vilches, C. and P. Parham, *KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 217-51.
17. Moretta, A., et al., *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Annu.Rev.Immunol., 2001. **19**: p. 197-223.

18. Lanier, L.L., *NK cell receptors*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 359-93.
19. Moretta, L., et al., *Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2011. **117**(3): p. 764-71.
20. Sivori, S., et al., *A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2*. Blood, 2010. **116**(10): p. 1637-47.
21. Ulbrecht, M., et al., *Interaction of HLA-E with peptides and the peptide transporter in vitro: implications for its function in antigen presentation*. J.Immunol., 1998. **160**(9): p. 4375-4385.
22. Kabat, J., et al., *Role that each NKG2A immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif plays in mediating the human CD94/NKG2A inhibitory signal*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1948-58.
23. Cerwenka, A. and L.L. Lanier, *NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer*. Tissue Antigens, 2003. **61**(5): p. 335-343.
24. Wedepohl, S., et al., *I-Selectin - A dynamic regulator of leukocyte migration*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(4): p. 257-64.
25. Marras, F., F. Bozzano, and A. De Maria, *Involvement of activating NK cell receptors and their modulation in pathogen immunity*. J Biomed Biotechnol. **2011**: p. 152430.
26. Fuchs, A., et al., *Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44*. Blood, 2005. **106**(6): p. 2076-82.
27. Bonaccorsi, I., et al., *The immune inhibitory receptor LAIR-1 is highly expressed by plasmacytoid dendritic cells and acts complementary with NKp44 to control IFNalpha production*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e15080.
28. Elboim, M., et al., *Tumor immunoediting by NKp46*. J Immunol, 2010. **184**(10): p. 5637-44.
29. Sanchez-Correa, B., et al., *Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(8): p. 1195-205.
30. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol., 2001. **22**(11): p. 633-640.
31. Cella, M., K. Otero, and M. Colonna, *Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1beta reveals intrinsic functional plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(24): p. 10961-6.
32. Vossen, M.T., et al., *CD27 defines phenotypically and functionally different human NK cell subsets*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3739-45.
33. Yu, J., et al., *CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets*. Blood, 2010. **115**(2): p. 274-81.
34. Walzer, T. and E. Vivier, *G-protein-coupled receptors in control of natural killer cell migration*. Trends Immunol, 2011. **32**(10): p. 486-92.

35. Frey, M., et al., *Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 400-8.
36. Zhang, A.L., et al., *Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2484-93.
37. Gerosa, F., et al., *Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells*. J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 327-33.
38. Della Chiesa, M., et al., *The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors*. Eur J Immunol, 2003. **33**(6): p. 1657-66.
39. Spaggiari, G.M., et al., *NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46*. Eur.J.Immunol., 2001. **31**(6): p. 1656-1665.
40. Lu, L., et al., *Regulation of activated CD4+ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 593-604.
41. Flodstrom-Tullberg, M., et al., *Natural killer cells in human autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(6): p. 634-40.
42. Ahern, D.J. and F.M. Brennan, *The role of Natural Killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: major contributors or essential homeostatic modulators?* Immunol Lett, 2011. **136**(2): p. 115-21.
43. French, A.R. and W.M. Yokoyama, *Natural killer cells and autoimmunity*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(1): p. 8-14.
44. Soderstrom, K., et al., *Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(29): p. 13028-33.
45. Lo, C.K., et al., *Natural killer cell degeneration exacerbates experimental arthritis in mice via enhanced interleukin-17 production*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(9): p. 2700-11.
46. Moins-Teisserenc, H.T., et al., *Association of a syndrome resembling Wegener's granulomatosis with low surface expression of HLA class-I molecules*. Lancet, 1999. **354**(9190): p. 1598-603.
47. Groh, V., et al., *Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9452-7.
48. Taylor, P.C. and M. Feldmann, *Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2009. **5**(10): p. 578-82.
49. Perona-Wright, G., et al., *Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(6): p. 503-12.
50. Phillips, J.H., et al., *Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes*. Science, 1995. **268**(5209): p. 403-5.
51. Toh, M.L. and P. Miossec, *The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets*. Curr Opin Rheumatol, 2007. **19**(3): p. 284-8.

52. Nissler, K., et al., *Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen induced arthritis: influence on macrophage activation*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(11): p. 1470-7.
53. Williams, R.O., et al., *Evaluation of TNF-alpha and IL-1 blockade in collagen-induced arthritis and comparison with combined anti-TNF-alpha/anti-CD4 therapy*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 7240-5.
54. Hasler, P., *Biological therapies directed against cells in autoimmune disease*. Springer Semin Immunopathol, 2006. **27**(4): p. 443-56.
55. Manoury-Schwartz, B., et al., *High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors*. J Immunol, 1997. **158**(11): p. 5501-6.
56. Boissier, M.C., et al., *Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis*. Eur J Immunol, 1995. **25**(5): p. 1184-90.
57. Lubberts, E., M.I. Koenders, and W.B. van den Berg, *The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(1): p. 29-37.
58. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 429-42.
59. Murphy, C.A., et al., *Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1951-7.
60. Alonso, R., et al., *Aberrant expression of CD6 on B-cell subsets from patients with Sjogren's syndrome*. J Autoimmun. **35**(4): p. 336-41.
61. Aruffo, A., et al., *The lymphocyte glycoprotein CD6 contains a repeated domain structure characteristic of a new family of cell surface and secreted proteins*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 949-52.
62. Gimferrer, I., et al., *Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2262-70.
63. Patel, D.D., et al., *Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human thymic epithelial cells*. J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1563-8.
64. Saifullah, M.K., et al., *Expression and characterization of a novel CD6 ligand in cells derived from joint and epithelial tissues*. J Immunol, 2004. **173**(10): p. 6125-33.
65. Frucht, D.M., et al., *IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge*. Trends Immunol, 2001. **22**(10): p. 556-60.
66. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. 1986. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 5-14.
67. Szabo, S.J., et al., *Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells*. Science, 2002. **295**(5553): p. 338-42.
68. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.

69. Hirota, K., et al., *T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 41-7.
70. Nomiyama, H., N. Osada, and O. Yoshie, *A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature*. Dev Comp Immunol. **35**(7): p. 705-15.
71. Robertson, M.J., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(2): p. 173-83.
72. Campbell, J.J., et al., *Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6477-82.
73. Inngjerdingen, M., B. Damaj, and A.A. Maghazachi, *Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells*. Blood, 2001. **97**(2): p. 367-75.
74. Taub, D.D., et al., *Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity*. J Immunol, 1995. **155**(8): p. 3877-88.
75. Maghazachi, A.A., A. al-Aoukaty, and T.J. Schall, *C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins*. J Immunol, 1994. **153**(11): p. 4969-77.
76. Lazennec, G. and A. Richmond, *Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation*. Trends Mol Med, 2010. **16**(3): p. 133-44.
77. Marshall, B.T., et al., *Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules*. Nature, 2003. **423**(6936): p. 190-3.
78. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
79. Brennan, F.M. and I.B. McInnes, *Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3537-45.
80. Pratt, A.G., J.D. Isaacs, and D.L. Matvey, *Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2009. **23**(1): p. 37-48.
81. Majka, D.S., et al., *Duration of preclinical rheumatoid arthritis-related autoantibody positivity increases in subjects with older age at time of disease diagnosis*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(6): p. 801-7.
82. Gravallesse, E.M., *Bone destruction in arthritis*. Ann Rheum Dis, 2002. **61 Suppl 2**: p. ii84-6.
83. Humby, F., et al., *Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium*. PLoS Med, 2009. **6**(1): p. e1.
84. Ospelt, C., et al., *Synovial activation in rheumatoid arthritis*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 2323-34.
85. Raza, K., et al., *Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(4): p. R784-95.

86. Ceman, S., et al., *MHC class II deletion mutant expresses normal levels of transgene encoded class II molecules that have abnormal conformation and impaired antigen presentation ability*. J Immunol, 1992. **149**(3): p. 754-61.
87. de Preval, C. and B. Mach, *The absence of beta 2-microglobulin in Daudi cells: active gene but inactive messenger RNA*. Immunogenetics, 1983. **17**(2): p. 133-40.
88. Betts, M.R., et al., *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation*. J Immunol Methods, 2003. **281**(1-2): p. 65-78.
89. Mollenhauer, H.H., D.J. Morre, and L.D. Rowe, *Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1031**(2): p. 225-46.
90. Zimmerman, A.W., et al., *Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells*. Blood, 2006. **107**(8): p. 3212-20.
91. Nair, P., et al., *CD6 synergistic co-stimulation promoting proinflammatory response is modulated without interfering with the activated leucocyte cell adhesion molecule interaction*. Clin Exp Immunol. **162**(1): p. 116-30.
92. Braun, M., et al., *The CD6 Scavenger Receptor Is Differentially Expressed on a CD56 Natural Killer Cell Subpopulation and Contributes to Natural Killer-Derived Cytokine and Chemokine Secretion*. J Innate Immun.
93. Vitale, M., et al., *NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis*. J.Exp.Med., 1998. **187**(12): p. 2065-2072.
94. Pende, D., et al., *Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells*. J.Exp.Med., 1999. **190**(10): p. 1505-1516.
95. Biassoni, R., et al., *The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity*. Eur.J.Immunol., 1999. **29**(3): p. 1014-1020.
96. Castro, M.A., et al., *Extracellular isoforms of CD6 generated by alternative splicing regulate targeting of CD6 to the immunological synapse*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4351-61.
97. Bowen, M.A., et al., *Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand*. J Exp Med, 1995. **181**(6): p. 2213-20.
98. Bowen, M.A., et al., *Structure and chromosomal location of the human CD6 gene: detection of five human CD6 isoforms*. J Immunol, 1997. **158**(3): p. 1149-56.
99. Colucci, F., et al., *Natural cytotoxicity uncoupled from the Syk and ZAP-70 intracellular kinases*. Nat.Immunol., 2002. **3**(3): p. 288-294.
100. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.

101. Dalbeth, N. and M.F. Callan, *A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(7): p. 1763-72.
102. Dalbeth, N., et al., *CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation*. J Immunol, 2004. **173**(10): p. 6418-26.
103. Manicourt, D.H., et al., *Synovial fluid levels of tumor necrosis factor alpha and oncostatin M correlate with levels of markers of the degradation of crosslinked collagen and cartilage aggrecan in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(2): p. 281-8.
104. Schleinitz, N., et al., *Natural killer cells in human autoimmune diseases*. Immunology. **131**(4): p. 451-8.
105. Ruth, J.H., et al., *Selective lymphocyte chemokine receptor expression in the rheumatoid joint*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(12): p. 2750-60.
106. Walzer, T. and E. Vivier, *G-protein-coupled receptors in control of natural killer cell migration*. Trends Immunol. **32**(10): p. 486-92.
107. Anegón, I., et al., *Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells*. J Exp Med, 1988. **167**(2): p. 452-72.
108. Marquez, M.E., et al., *CD16 cross-linking induces increased expression of CD56 and production of IL-12 in peripheral NK cells*. Cell Immunol, 2010. **264**(1): p. 86-92.
109. Poli, A., et al., *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 458-65.
110. de Matos, C.T., et al., *Activating and inhibitory receptors on synovial fluid natural killer cells of arthritis patients: role of CD94/NKG2A in control of cytokine secretion*. Immunology, 2007. **122**(2): p. 291-301.
111. Caligiuri, M.A., et al., *Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors*. J Exp Med, 1990. **171**(5): p. 1509-26.
112. Romagnani, C., et al., *CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 4947-55.
113. Freud, A.G., et al., *A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 295-304.
114. Fehniger, T.A., et al., *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. Blood, 2003. **101**(8): p. 3052-7.
115. Ferlazzo, G., et al., *The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1455-62.
116. Zhang, C., et al., *[The negative regulatory effect of IFN-gamma on cognitive function of human natural killer cells]*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2004. **26**(6): p. 324-7.

117. Groh, V., et al., *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation*. Nature, 2002. **419**(6908): p. 734-8.
118. Burgess, S.J., et al., *IL-21 Down-Regulates NKG2D/DAP10 Expression on Human NK and CD8+ T Cells*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1490-7.
119. Burgess, S.J., et al., *The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications*. Immunol Res, 2008. **40**(1): p. 18-34.
120. Alonso-Ramirez, R., et al., *Rationale for Targeting CD6 as a Treatment for Autoimmune Diseases*. Arthritis, 2010. **2010**: p. 130646.
121. Cayrol, R., et al., *Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system*. Nat Immunol, 2008. **9**(2): p. 137-45.
122. Berahovich, R.D., et al., *Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7833-40.
123. Johnson, T.A., et al., *Reduction of the peripheral blood CD56(bright) NK lymphocyte subset in FTY720-treated multiple sclerosis patients*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 570-9.
124. Conigliaro, P., et al., *Emerging role for NK cells in the pathogenesis of inflammatory arthropathies*. Autoimmun Rev, 2011. **10**(10): p. 577-81.
125. Page, C.E., et al., *Interferon-gamma inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(2): p. R49.
126. Takayanagi, H., et al., *T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma*. Nature, 2000. **408**(6812): p. 600-5.
127. Veys, E.M., C.J. Menkes, and P. Emery, *A randomized, double-blind study comparing twenty-four-week treatment with recombinant interferon-gamma versus placebo in the treatment of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(1): p. 62-8.
128. Pierer, M., et al., *Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 1256-65.
129. Tak, P.P. and J.R. Kalden, *Advances in rheumatology: new targeted therapeutics*. Arthritis Res Ther, 2011. **13 Suppl 1**: p. S5.
130. Song, K., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression*. J Exp Med, 2000. **191**(7): p. 1095-104.
131. Zauli, G., et al., *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) blocks osteoclastic differentiation induced by RANKL plus M-CSF*. Blood, 2004. **104**(7): p. 2044-50.
132. Morel, J., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 15709-18.
133. Calmon-Hamaty, F., et al., *Lymphotoxin alpha stimulates proliferation and pro-inflammatory cytokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Cytokine, 2011. **53**(2): p. 207-14.

134. Buch, M.H., et al., *True infliximab resistance in rheumatoid arthritis: a role for lymphotoxin alpha?* Ann Rheum Dis, 2004. **63**(10): p. 1344-6.
135. Calmon-Hamaty, F., et al., *Lymphotoxin alpha revisited: general features and implications in rheumatoid arthritis.* Arthritis Res Ther, 2011. **13**(4): p. 232.
136. Tokayer, A., et al., *High levels of interleukin 13 in rheumatoid arthritis sera are modulated by tumor necrosis factor antagonist therapy: association with dendritic cell growth activity.* J Rheumatol, 2002. **29**(3): p. 454-61.
137. Udagawa, N., *The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis.* J Bone Miner Metab, 2003. **21**(6): p. 337-43.
138. Torikai, E., et al., *The effect of infliximab on chemokines in patients with rheumatoid arthritis.* Clin Rheumatol, 2007. **26**(7): p. 1088-93.
139. Klimiuk, P.A., et al., *The changes in serum chemokines following leflunomide therapy in patients with rheumatoid arthritis.* Clin Rheumatol, 2009. **28**(1): p. 17-21.
140. Jarahian, M., et al., *Modulation of NKp30- and NKp46-mediated natural killer cell responses by poxviral hemagglutinin.* PLoS Pathog, 2011. **7**(8): p. e1002195.
141. Lubberts, E., *Th17 cytokines and arthritis.* Semin Immunopathol, 2010. **32**(1): p. 43-53.
142. Ikeuchi, H., et al., *Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(4): p. 1037-46.
143. Leipe, J., et al., *Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis, 2011. **70**(8): p. 1453-7.
144. Miossec, P., *Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(3): p. 594-601.

B. Anhang

Tabelle 1: Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler zu Abbildung 12.

| | | | Mittelwert | Standard- abweichung | Standard- fehler |
|-------------------------|---------|-------|------------|-------------------------|---------------------|
| CD56+/CD3- NK-Zellen | CD16- | CD6+ | 2,528 | 1,885 | 0,457 |
| | | CD6- | 6,749 | 3,526 | 0,855 |
| | CD16+ | CD6+ | 69,190 | 12,030 | 2,917 |
| | | CD6- | 21,540 | 11,080 | 2,687 |
| CD56+/CD3- NK-Zellen | CD56++ | CD6+ | 1,221 | 0,837 | 0,203 |
| | | CD6- | 5,394 | 3,281 | 0,796 |
| | CD56dim | CD6+ | 70,490 | 11,890 | 2,883 |
| | | CD6- | 22,890 | 11,020 | 2,672 |
| CD56+/CD3- NK-Zellen | CD56++ | CD16+ | 3,128 | 1,701 | 0,413 |
| | | CD16- | 3,488 | 2,380 | 0,577 |
| | CD56dim | CD16+ | 87,600 | 5,636 | 1,367 |
| | | CD16- | 5,789 | 3,749 | 0,909 |
| CD3+/CD56- T-Zellen | CD16- | CD6+ | 98,030 | 2,316 | 0,669 |
| | | CD6- | 0,375 | 0,429 | 0,124 |
| | CD16+ | CD6+ | 1,542 | 2,105 | 0,608 |
| | | CD6- | 0,050 | 0,067 | 0,019 |
| CD3+/CD56- T-Zellen | CD6+ | | 99,580 | 0,445 | 0,128 |
| | CD6- | | 0,333 | 0,438 | 0,126 |
| | CD16+ | | 1,608 | 2,154 | 0,622 |
| | CD16- | | 98,390 | 2,154 | 0,622 |

Tabelle 2: Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler zu Abbildung 13 (Seite 63).

| | | Mittelwert | Standard- abweichung | Standard- fehler |
|----------------------|-------|------------|-------------------------|---------------------|
| CD56++ NK-Zellen | NKp46 | 98,88 | 0,8496 | 0,2687 |
| | NKp30 | 51,64 | 30,52 | 9,651 |
| | NKp44 | 10,73 | 10,83 | 3,424 |
| | NKG2D | 79,46 | 18,5 | 5,849 |
| | CD94 | 97,89 | 2,919 | 0,9232 |
| | NKG2A | 93,19 | 4,844 | 1,532 |
| CD56dim NK-Zellen | NKp46 | 85,11 | 8,663 | 2,74 |
| | NKp30 | 83,87 | 13,78 | 4,359 |
| | NKp44 | 3,4 | 2,38 | 1,064 |
| | NKG2D | 77,58 | 20,68 | 7,313 |
| | CD94 | 78,79 | 14,9 | 4,711 |
| | NKG2A | 67,43 | 15,42 | 4,877 |
| CD3pos T-Zellen | NKp46 | 1,41 | 0,7078 | 0,2238 |
| | NKp30 | 1,344 | 0,8918 | 0,2973 |
| | NKp44 | 1,14 | 0,8356 | 0,2642 |
| | NKG2D | 33,06 | 7,35 | 2,324 |
| | CD94 | 5,69 | 3,528 | 1,116 |
| | NKG2A | 3,09 | 1,146 | 0,3625 |

Tabelle 3: Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler zu Abbildung 25 (Seite 86).

| Arthritis | | | Mittelwert | Standard- abweichung | Standard- fehler |
|-----------|------------|-------|------------|-------------------------|---------------------|
| PBMC | CD56bright | CD16- | 3,781 | 2,904 | 0,6493 |
| | | CD16+ | 6,33 | 5,197 | 1,162 |
| | CD56dim | CD16- | 3,706 | 4,136 | 0,9249 |
| | | CD16+ | 86,17 | 7,654 | 1,711 |
| | CD56bright | CD6- | 8,824 | 6,585 | 1,472 |
| | | CD6+ | 1,287 | 0,9114 | 0,2038 |
| | CD56dim | CD6- | 44,88 | 21,52 | 4,811 |
| | | CD6+ | 45 | 22,78 | 5,093 |

| | | | | | |
|------|------------|-------|-------|-------|--------|
| SFMC | CD56bright | CD16- | 59,11 | 17,27 | 3,153 |
| | | CD16+ | 28,04 | 15,23 | 2,781 |
| | CD56dim | CD16- | 6,836 | 7,295 | 1,332 |
| | | CD16+ | 6,011 | 9,463 | 1,728 |
| | CD56bright | CD6- | 83,92 | 13,63 | 2,489 |
| | | CD6+ | 3,231 | 2,569 | 0,469 |
| | CD56dim | CD6- | 10,68 | 10,72 | 1,958 |
| | | CD6+ | 2,169 | 4,317 | 0,7882 |

| Arthrose | | | Mittelwert | Standard-abweichung | Standard-fehler |
|----------|------------|-------|------------|---------------------|-----------------|
| PBMC | CD56bright | CD16- | 3,189 | 1,911 | 0,3677 |
| | | CD16+ | 3,556 | 2,05 | 0,3945 |
| | CD56dim | CD16- | 4,615 | 4,231 | 0,8142 |
| | | CD16+ | 88,64 | 6,061 | 1,167 |
| | CD56bright | CD6- | 6,045 | 3,346 | 0,6213 |
| | | CD6+ | 1,052 | 0,7712 | 0,1432 |
| | CD56dim | CD6- | 36,3 | 17,4 | 3,231 |
| | | CD6+ | 56,6 | 17,95 | 3,333 |
| SFMC | CD56bright | CD16- | 70,61 | 10,47 | 3,702 |
| | | CD16+ | 13,04 | 7,676 | 2,714 |
| | CD56dim | CD16- | 12,23 | 5,664 | 2,003 |
| | | CD16+ | 4,125 | 3,809 | 1,347 |
| | CD56bright | CD6- | 79,11 | 10,07 | 3,56 |
| | | CD6+ | 4,538 | 4,306 | 1,522 |
| | CD56dim | CD6- | 14,16 | 6,596 | 2,332 |
| | | CD6+ | 2,188 | 2,323 | 0,8212 |

Tabelle 4: Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler zu Abbildung 26 (Seite 93).

| aus SFMC der Arthritis Patienten | | Mittelwert | Standard-abweichung | Standard-fehler |
|----------------------------------|-------|------------|---------------------|-----------------|
| CD56++ NK-Zellen | NKp46 | 90,18 | 6,753 | 2,135 |
| | NKp30 | 24,14 | 17,75 | 5,613 |
| | NKp44 | 3,77 | 2,579 | 0,8154 |
| | NKG2D | 54,18 | 18,27 | 5,778 |
| | CD94 | 91,26 | 4,814 | 1,522 |
| | NKG2A | 88,37 | 4,029 | 1,274 |

| | | | | |
|--------------------|-------|-------|--------|--------|
| CD3pos T-Zellen | NKp46 | 1,78 | 0,9864 | 0,3119 |
| | NKp30 | 1,87 | 1,041 | 0,3293 |
| | NKp44 | 1,47 | 1,341 | 0,424 |
| | NKG2D | 33,69 | 13,84 | 4,375 |
| | CD94 | 4,2 | 2,745 | 0,8679 |
| | NKG2A | 2,62 | 1,642 | 0,5194 |

| aus PBMC der Arthritis Patienten | | Mittelwert | Standard-abweichung | Standard-fehler |
|----------------------------------|-------|------------|---------------------|-----------------|
| CD56++ NK-Zellen | NKp46 | 97,1 | 2,729 | 1,114 |
| | NKp30 | 19,1 | 12,8 | 5,226 |
| | NKp44 | 4,467 | 3,346 | 1,366 |
| | NKG2D | 82,84 | 12,8 | 5,726 |
| | CD94 | 94,18 | 3,568 | 1,457 |
| | NKG2A | 86,9 | 5,371 | 2,193 |

| | | | | |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| CD56dim NK-Zellen | NKp46 | 74,28 | 13,6 | 5,554 |
| | NKp30 | 30,47 | 6,106 | 2,493 |
| | NKp44 | 3,383 | 2,752 | 1,124 |
| | NKG2D | 69,78 | 23,13 | 10,34 |
| | CD94 | 55,8 | 12,98 | 5,3 |
| | NKG2A | 41,45 | 9,755 | 3,983 |

| | | | | |
|--------------------|-------|-------|--------|--------|
| CD3pos T-Zellen | NKp46 | 1,4 | 0,8036 | 0,2841 |
| | NKp30 | 1,525 | 1,226 | 0,4333 |
| | NKp44 | 1,025 | 0,7888 | 0,2789 |
| | NKG2D | 23,8 | 10,47 | 4,275 |
| | CD94 | 3,713 | 2,873 | 1,016 |
| | NKG2A | 2,838 | 2,477 | 0,8759 |

Tabelle 5: Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler zu Abbildung 31 (Seite 105).

| | | | Mittelwert | Standard- abweichung | Standard- fehler |
|--------|-----------|----|------------|-------------------------|---------------------|
| IFNg | Arthritis | Se | 1007 | 1129 | 183,2 |
| | | SF | 882,1 | 2400 | 339,5 |
| | Arthrose | Se | 749,8 | 815,1 | 121,5 |
| | | SF | 23,06 | 23,4 | 3,378 |
| IL-17 | Arthritis | Se | 90,58 | 80,98 | 13,14 |
| | | SF | 46,84 | 71,96 | 10,18 |
| | Arthrose | Se | 76,08 | 62,26 | 9,281 |
| | | SF | 9,116 | 7,79 | 1,124 |
| IL-22 | Arthritis | Se | 164,5 | 276,6 | 60,35 |
| | | SF | 217,6 | 244,8 | 42,61 |
| | Arthrose | Se | 85,6 | 69,69 | 12,13 |
| | | SF | 62,55 | 42,61 | 8,356 |
| IL-13 | Arthritis | Se | 24,64 | 26,12 | 4,237 |
| | | SF | 21,39 | 55,33 | 7,825 |
| | Arthrose | Se | 18,85 | 12,49 | 1,862 |
| | | SF | 12,12 | 10,91 | 1,575 |
| IL-6 | Arthritis | Se | 66,97 | 62,34 | 10,11 |
| | | SF | 685 | 769,7 | 110 |
| | Arthrose | Se | 53,66 | 52,62 | 7,844 |
| | | SF | 230,1 | 411,4 | 59,39 |
| TNFa | Arthritis | Se | 212,9 | 353 | 57,26 |
| | | SF | 312,4 | 744,4 | 105,3 |
| | Arthrose | Se | 118,1 | 140,5 | 20,94 |
| | | SF | 62,48 | 131,1 | 18,93 |
| TRAIL | Arthritis | Se | 597,3 | 264,2 | 43,44 |
| | | SF | 776,5 | 937,6 | 132,6 |
| | Arthrose | Se | 505,4 | 176 | 26,24 |
| | | SF | 410,3 | 143,5 | 20,72 |
| TNFb | Arthritis | Se | 41,5 | 23,67 | 3,84 |
| | | SF | 45,34 | 34,51 | 4,88 |
| | Arthrose | Se | 24,09 | 13,88 | 2,07 |
| | | SF | 16,95 | 8,79 | 1,269 |
| GM-CSF | Arthritis | Se | 225,8 | 352,7 | 57,22 |
| | | SF | 108,8 | 233,2 | 33,32 |
| | Arthrose | Se | 147,6 | 172,2 | 25,67 |
| | | SF | 70,35 | 64,14 | 9,258 |

Tabelle 6: Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler zu Abbildung 33 (Seite 111).

| | | | Mittelwert | Standard- abweichung | Standard- fehler |
|-------------------------|-----------|----|------------|-------------------------|---------------------|
| RANTES (CCL5) | Arthritis | Se | 1153 | 959,2 | 155,6 |
| | | SF | 171,5 | 276,6 | 39,12 |
| | Arthrose | Se | 872,2 | 507,6 | 75,67 |
| | | SF | 198,9 | 360,1 | 51,98 |
| MIP1 β (CCL4) | Arthritis | Se | 46,4 | 41,28 | 6,696 |
| | | SF | 301,1 | 508,6 | 71,92 |
| | Arthrose | Se | 56,24 | 38,17 | 5,691 |
| | | SF | 128,8 | 326 | 47,06 |
| MIP1 α (CCL3) | Arthritis | Se | 23,6 | 23,86 | 3,87 |
| | | SF | 15,22 | 22,36 | 3,162 |
| | Arthrose | Se | 21,93 | 20,2 | 3,011 |
| | | SF | 6,284 | 19,75 | 2,851 |
| IP-10 (CXCL10) | Arthritis | Se | 665,9 | 957,3 | 155,3 |
| | | SF | 3420 | 4484 | 634,1 |
| | Arthrose | Se | 383,5 | 181,8 | 27,11 |
| | | SF | 1413 | 1501 | 216,7 |
| MIG (CXCL9) | Arthritis | Se | 516 | 483,3 | 78,4 |
| | | SF | 2988 | 2078 | 293,9 |
| | Arthrose | Se | 427,7 | 302,2 | 45,05 |
| | | SF | 730,7 | 624,5 | 90,13 |
| EOTAXIN | Arthritis | Se | 152,5 | 181,3 | 29,41 |
| | | SF | 68,63 | 124,3 | 17,58 |
| | Arthrose | Se | 76,23 | 50,8 | 7,572 |
| | | SF | 16,73 | 10,7 | 1,544 |

| | | | | | |
|---------------------------|-----------|----|-------|-------|-------|
| IL-8 (CXCL8) | Arthritis | Se | 26,71 | 24,45 | 3,966 |
| | | SF | 574,4 | 1033 | 146,1 |
| | Arthrose | Se | 28,36 | 25,47 | 3,796 |
| | | SF | 316 | 508,8 | 73,43 |
| GRO α (CXCL1) | Arthritis | Se | 121,7 | 60,38 | 9,796 |
| | | SF | 624,9 | 804,2 | 113,7 |
| | Arthrose | Se | 67,08 | 33,87 | 5,05 |
| | | SF | 167,4 | 317 | 45,75 |
| SDF1 α (CXCL12) | Arthritis | Se | 265,4 | 119,3 | 19,35 |
| | | SF | 446,6 | 467,6 | 66,13 |
| | Arthrose | Se | 253,1 | 80,16 | 11,95 |
| | | SF | 235,4 | 112,1 | 16,18 |

Abbildung 37: DNS Sequenzvergleich: Referenzsequenz NM_006725.3 mit den NKL-PCR-Amplifikaten (Abbildung 14, Seite 66).

Der Vergleich zeigt eine übereinstimmende Nukleotidsequenz in den überlappenden Sequenzbereichen, der NKL PCR Amplifikate, nach der Behandlung mit und ohne IL-2. Gemäß der Referenzsequenz NM_006725.3 können somit die Splicevarianten CD6VL (1008 bp), deltaExon8 (912 bp), deltaExon5 (705 bp) und deltaExon5/8 (609 bp) nachgewiesen werden.

| Exon 4 | Exon 5 | Exon 6 | Exon 7 | Exon 8 | Exon 9 | Exon 10 |
|---|---|--------|--------|--------|--------|---------|
| 5' und 3' Primersequenz (5'd3_2 GGATCAGTGTGCGATGACA; 3'_CD6_D GAGGAGGTCCAGCAAAGC) <i>kursiv</i> = Nukleotidunterschied | | | | | | |
| referenz Sequenz | GCTGGAGCATGGCGAGTGGGGATCAGTGTGCGATGACACTTGGGACCTGG | | | | | 800 |
| NKL-mit IL-2_dEx5 | -----GGATCAGTGTGCGATGACACTTGGGACCTGG | | | | | 31 |
| NKL-mit IL-2_volle Länge | -----CTTGGGACCTGG | | | | | 12 |
| NKL-mit IL-2_dEx8 | -----CTTGGGACCTGG | | | | | 12 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5 | -----GGATCAGTGTGCGATGACACTTGGGACCTGG | | | | | 31 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5+8 | -----GGATCAGTGTGCGATGACACTTGGGACCTGG | | | | | 31 |
| NKL-ohne IL-2_volle Länge | -----CTTGGGACCTGG | | | | | 12 |
| | ***** | | | | | |
| referenz Sequenz | AGGACGCCCACGTGGTGTGCAGGCAACTGGGCTGCGGCTGGGAGTCCAG | | | | | 850 |
| NKL-mit IL-2_dEx5 | AGGACGCCCACGTGGTGTGCAGGCAACTGGGCTGCGGCTGGGAGTCCAG | | | | | 81 |
| NKL-mit IL-2_volle Länge | AGGACGCCCACGTGGTGTGCAGGCAACTGGGCTGCGGCTGGGAGTCCAG | | | | | 62 |
| NKL-mit IL-2_dEx8 | AGGACGCCCACGTGGTGTGCAGGCAACTGGGCTGCGGCTGGGAGTCCAG | | | | | 62 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5 | AGGACGCCCACGTGGTGTGCAGGCAACTGGGCTGCGGCTGGGAGTCCAG | | | | | 81 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5+8 | AGGACGCCCACGTGGTGTGCAGGCAACTGGGCTGCGGCTGGGAGTCCAG | | | | | 81 |
| NKL-ohne IL-2_volle Länge | AGGACGCCCACGTGGTGTGCAGGCAACTGGGCTGCGGCTGGGAGTCCAG | | | | | 62 |
| | ***** | | | | | |
| referenz Sequenz | GCCCTGCCCGGCTTGCACTTCACGCCCGGCCGCGGGCCTATCCACCGGGA | | | | | 900 |
| NKL-mit IL-2_volle Länge | GCCCTGCCCGGCTTGCACTTCACGCCCGGCCGCGGGCCTATCCACYGGGA | | | | | 112 |
| NKL-mit IL-2_dEx8 | GCCCTGCCCGGCTTGCACTTCACGCCCGGCCGCGGGCCTATCCACYGGGA | | | | | 112 |
| NKL-mit IL-2_dEx5 | GCCCTGCCCGGCTTGCACTTCACGCCCGGCCGCGGGCCTATCCACYGGGA | | | | | 131 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5 | GCCCTGCCCGGCTTGCACTTCACGCCCGGCCGCGGGCCTATCCACYGGGA | | | | | 131 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5+8 | GCCCTGCCCGGCTTGCACTTCACGCCCGGCCGCGGGCCTATCCACYGGGA | | | | | 131 |
| NKL-ohne IL-2_volle Länge | GCCCTGCCCGGCTTGCACTTCACGCCCGGCCGCGGGCCTATCCACYGGGA | | | | | 112 |
| | ***** | | | | | |
| referenz Sequenz | CCAGGTGAACGTGCTCGGGGGCCGAAGCTTACCTGTGGGACTGCCCGGGGC | | | | | 950 |
| NKL-mit IL-2_volle Länge | CCAGGTGAACGTGCTCGGGGGCCGAAGCTTACCTGTGGGACTGCCCGGGGC | | | | | 162 |
| NKL-mit IL-2_dEx8 | CCAGGTGAACGTGCTCGGGGGCCGAAGCTTACCTGTGGGACTGCCCGGGGC | | | | | 162 |
| NKL-mit IL-2_dEx5 | CCAGGTGAACGTGCTCGGGGGCCGAAGCTTACCTGTGGGACTGCCCGGGGC | | | | | 181 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5 | CCAGGTGAACGTGCTCGGGGGCCGAAGCTTACCTGTGGGACTGCCCGGGGC | | | | | 181 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5+8 | CCAGGTGAACGTGCTCGGGGGCCGAAGCTTACCTGTGGGACTGCCCGGGGC | | | | | 181 |
| NKL-ohne IL-2_volle Länge | CCAGGTGAACGTGCTCGGGGGCCGAAGCTTACCTGTGGGACTGCCCGGGGC | | | | | 162 |
| | ***** | | | | | |
| referenz Sequenz | TGCCAGGACAGCACTACTGCGGCCACAAGAGGACGCGGGCGCGGGTGTGC | | | | | 1000 |
| NKL-mit IL-2_volle Länge | TGCCAGGACAGCACTACTGCGGCCACAAGAGGACGCGGGCGYGGTGTGC | | | | | 212 |
| NKL-mit IL-2_dEx8 | TGCCAGGACAGCACTACTGCGGCCACAAGAGGACGCGGGCGYGGTGTGC | | | | | 212 |
| NKL-mit IL-2_dEx5 | TGCCAGGACAGCACTACTGCGGCCACAAGAGGACGCGGGCGYGGTGTGC | | | | | 231 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5 | TGCCAGGACAGCACTACTGCGGCCACAAGAGGACGCGGGCGYGGTGTGC | | | | | 231 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5+8 | TGCCAGGACAGCACTACTGCGGCCACAAGAGGACGCGGGCGYGGTGTGC | | | | | 231 |
| NKL-ohne IL-2_volle Länge | TGCCAGGACAGCACTACTGCGGCCACAAGAGGACGCGGGCGYGGTGTGC | | | | | 212 |
| | ***** | | | | | |
| referenz Sequenz | TCAGAGCACCAGTCTTGCGCCTGACAGGGGGCGCTGACCGCTGCGAGGG | | | | | 1050 |
| NKL-mit IL-2_volle Länge | TCAGAGCACCAGTCTTGCGCCTGACAGGGGGCGCTGACCGCTGCGAGGG | | | | | 262 |
| NKL-mit IL-2_dEx8 | TCAGAGCACCAGTCTTGCGCCTGACAGGGGGCGCTGACCGCTGCGAGGG | | | | | 262 |
| NKL-mit IL-2_dEx5 | TCAG----- | | | | | 235 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5 | TCAG----- | | | | | 235 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5+8 | TCAG----- | | | | | 235 |
| NKL-ohne IL-2_volle Länge | TCAGAGCACCAGTCTTGCGCCTGACAGGGGGCGCTGACCGCTGCGAGGG | | | | | 262 |
| | **** | | | | | |

referenz Sequenz GCAGGTGGAGGTACACTTCCGAGGGGTCTGGAACACAGTGTGTGACAGTG 1100
 NKL-mit IL-2_volle Länge GCAGGTGGAGGTACACTTCCGAGGGGTCTGGAACACAGTGTGTGACAGTG 312
 NKL-mit IL-2_dEx8 GCAGGTGGAGGTACACTTCCGAGGGGTCTGGAACACAGTGTGTGACAGTG 312
 NKL-mit IL-2_dEx5 -----
 NKL-ohne IL-2_dEx5 -----
 NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ -----
 NKL-ohne IL-2_volle Länge GCAGGTGGAGGTACACTTCCGAGGGGTCTGGAACACAGTGTGTGACAGTG 312

referenz Sequenz AGTGGTACCCATCGGAGGCCAAGGTGCTCTGCCAGTCCTTGGGCTGTGGA 1150
 NKL-mit IL-2_volle Länge AGTGGTACCCATCGGAGGCCAAGGTGCTCTGCCAGTCCTTGGGCTGTGGA 362
 NKL-mit IL-2_dEx8 AGTGGTACCCATCGGAGGCCAAGGTGCTCTGCCAGTCCTTGGGCTGTGGA 362
 NKL-mit IL-2_dEx5 -----
 NKL-ohne IL-2_dEx5 -----
 NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ -----
 NKL-ohne IL-2_volle Länge AGTGGTACCCATCGGAGGCCAAGGTGCTCTGCCAGTCCTTGGGCTGTGGA 362

referenz Sequenz ACTGCGGTGAGAGGCCAAGGGGTGCCCCACTCCTTGTCCGGCAGGAT 1200
 NKL-mit IL-2_dEx5 ACTGCGGTGAGAGGCCAAGGGGTGCCCCACTCCTTGTCCGGCAGGAT 412
 NKL-mit IL-2_volle Länge ACTGCGGTGAGAGGCCAAGGGGTGCCCCACTCCTTGTCCGGCAGGAT 412
 NKL-mit IL-2_dEx8 ACTGCGGTGAGAGGCCAAGGGGTGCCCCACTCCTTGTCCGGCAGGAT 412
 NKL-ohne IL-2_dEx5 -----
 NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ -----
 NKL-ohne IL-2_volle Länge ACTGCGGTGAGAGGCCAAGGGGTGCCCCACTCCTTGTCCGGCAGGAT 412

referenz Sequenz GTACTACTCATGCAATGGGAGGAGCTCACCTCTCCAAGTCTCTGGC 1250
 NKL-mit IL-2_volle Länge GTACTACTCATGCAATGGGAGGAGCTCACCTCTCCAAGTCTCTGGC 462
 NKL-mit IL-2_dEx8 GTACTACTCATGCAATGGGAGGAGCTCACCTCTCCAAGTCTCTGGC 462
 NKL-mit IL-2_dEx5 -----
 NKL-ohne IL-2_dEx5 -----
 NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ -----
 NKL-ohne IL-2_volle Länge GTACTACTCATGCAATGGGAGGAGCTCACCTCTCCAAGTCTCTGGC 462

referenz Sequenz GGTTCACAACACTCCAACCTCTGCAGCCAGTCGCTGGCAGCCAGGGTCCTC 1300
 NKL-mit IL-2_volle Länge GGTTCACAACACTCCAACCTCTGCAGCCAGTCGCTGGCAGCCAGGGTCCTC 512
 NKL-mit IL-2_dEx8 GGTTCACAACACTCCAACCTCTGCAGCCAGTCGCTGGCAGCCAGGGTCCTC 512
 NKL-mit IL-2_dEx5 -----
 NKL-ohne IL-2_dEx5 -----
 NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ -----
 NKL-ohne IL-2_volle Länge GGTTCACAACACTCCAACCTCTGCAGCCAGTCGCTGGCAGCCAGGGTCCTC 512

referenz Sequenz TGCTCAGCTTCCCGGAGTTTGCACAATCTGTCCACTCCCGAAGTCCCTGC 1350
 NKL-mit IL-2_volle Länge TGCTCAGCTTCCCGGAGTTTGCACAATCTGTCCACTCCCGAAGTCCCTGC 562
 NKL-mit IL-2_dEx8 TGCTCAGCTTCCCGGAGTTTGCACAATCTGTCCACTCCCGAAGTCCCTGC 562
 NKL-mit IL-2_dEx5 -----CTTCCCGGAGTTTGCACAATCTGTCCACTCCCGAAGTCCCTGC 278
 NKL-ohne IL-2_dEx5 -----CTTCCCGGAGTTTGCACAATCTGTCCACTCCCGAAGTCCCTGC 278
 NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ -----CTTCCCGGAGTTTGCACAATCTGTCCACTCCCGAAGTCCCTGC 278
 NKL-ohne IL-2_volle Länge TGCTCAGCTTCCCGGAGTTTGCACAATCTGTCCACTCCCGAAGTCCCTGC 562

Exon 6

referenz Sequenz AAGTGTTCAGACAGTCACATAGAAATCTCTGTGACAGTGAAAAATAGAGA 1400
 NKL-mit IL-2_volle Länge AAGTGTTCAGACAGTCACATAGAAATCTCTGTGACAGTGAAAAATAGAGA 612
 NKL-mit IL-2_dEx8 AAGTGTTCAGACAGTCACATAGAAATCTCTGTGACAGTGAAAAATAGAGA 612
 NKL-mit IL-2_dEx5 AAGTGTTCAGACAGTCACATAGAAATCTCTGTGACAGTGAAAAATAGAGA 328
 NKL-ohne IL-2_dEx5 AAGTGTTCAGACAGTCACATAGAAATCTCTGTGACAGTGAAAAATAGAGA 328
 NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ AAGTGTTCAGACAGTCACATAGAAATCTCTGTGACAGTGAAAAATAGAGA 328
 NKL-ohne IL-2_volle Länge AAGTGTTCAGACAGTCACATAGAAATCTCTGTGACAGTGAAAAATAGAGA 612

Exon 7

referenz Sequenz ACAAGGAATCTCGGGAGCTAATGCTCCTCATCCCCCTCCATCGTTCTGGGA 1450
 NKL-mit IL-2_volle Länge ACAAGGAATCTCGGGAGCTAATGCTCCTCATCCCCCTCCATCGTTCTGGGA 662
 NKL-mit IL-2_dEx8 ACAAGGAATCTCGGGAGCTAATGCTCCTCATCCCCCTCCATCGTTCTGGGA 662
 NKL-mit IL-2_dEx5 ACAAGGAATCTCGGGAGCTAATGCTCCTCATCCCCCTCCATCGTTCTGGGA 378
 NKL-ohne IL-2_dEx5 ACAAGGAATCTCGGGAGCTAATGCTCCTCATCCCCCTCCATCGTTCTGGGA 378
 NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ ACAAGGAATCTCGGGAGCTAATGCTCCTCATCCCCCTCCATCGTTCTGGGA 378
 NKL-ohne IL-2_volle Länge ACAAGGAATCTCGGGAGCTAATGCTCCTCATCCCCCTCCATCGTTCTGGGA 662

referenz Sequenz ATTCTCCTCCTTGGCTCCCTCATCTTCATAGCCTTCATCCTCTTGAGAAT 1500
 NKL-mit IL-2_volle Länge ATTCTCCTCCTTGGCTCCCTCATCTTCATAGCCTTCATCCTCTTGAGAAT 712
 NKL-mit IL-2_dEx8 ATTCTCCTCCTTGGCTCCCTCATCTTCATAGCCTTCATCCTCTTGAGAAT 712
 NKL-mit IL-2_dEx5 ATTCTCCTCCTTGGCTCCCTCATCTTCATAGCCTTCATCCTCTTGAGAAT 428
 NKL-ohne IL-2_dEx5 ATTCTCCTCCTTGGCTCCCTCATCTTCATAGCCTTCATCCTCTTGAGAAT 428
 NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ ATTCTCCTCCTTGGCTCCCTCATCTTCATAGCCTTCATCCTCTTGAGAAT 428
 NKL-ohne IL-2_volle Länge ATTCTCCTCCTTGGCTCCCTCATCTTCATAGCCTTCATCCTCTTGAGAAT 712

referenz Sequenz TAAAGGAAAAATATGCCCTCCCCGTAATGGTGAACCACCAGCACCTACCCA 1550
 NKL-mit IL-2_volle Länge TAAAGGAAAAATATGCCCTCCCCGTAATGGTGAACCACCAGCACCTACCCA 762
 NKL-mit IL-2_dEx8 TAAAGGAAAAATATG----- 726
 NKL-mit IL-2_dEx5 TAAAGGAAAAATATGCCCTCCCCGTAATGGTGAACCACCAGCACCTACCCA 478
 NKL-ohne IL-2_dEx5 TAAAGGAAAAATATGCCCTCCCCGTAATGGTGAACCACCAGCACCTACCCA 478
 NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ TAAAGGAAAAATATG----- 442
 NKL-ohne IL-2_volle Länge TAAAGGAAAAATATGCCCTCCCCGTAATGGTGAACCACCAGCACCTACCCA 762

Exon 8

| | | |
|---------------------------|--|------|
| referenz Sequenz | CCACCATCCCGGCAGGGAGCAATAGCTATCAACCGGTCCCCATCACCATC | 1600 |
| NKL-mit IL-2_volle Länge | CCACCATCCCGGCAGGGAGCAATAGCTATCAACCGGTCCCCATCACCATC | 812 |
| NKL-mit IL-2_dEx8 | ----- | |
| NKL-mit IL-2_dEx5 | CCACCATCCCGGCAGGGAGCAATAGCTATCAACCGGTCCCCATCACCATC | 528 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5 | CCACCATCCCGGCAGGGAGCAATAGCTATCAACCGGTCCCCATCACCATC | 528 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ | ----- | |
| NKL-ohne IL-2_volle Länge | CCACCATCCCGGCAGGGAGCAATAGCTATCAACCGGTCCCCATCACCATC | 812 |

| | | |
|---------------------------|---|------|
| referenz Sequenz | CCCAAAGAAGTTTTCATGCTGCCCATCCAGGTCCAGGCCCGCCCCCTGA | 1650 |
| NKL-mit IL-2_volle Länge | CCCAAAGAAGTTTTCATGCTGCCCATCCAGGTCCAGGCCCGCCCCCTGA | 862 |
| NKL-mit IL-2_dEx8 | -----TTTTCATGCTGCCCATCCAGGTCCAGGCCCGCCCCCTGA | 766 |
| NKL-mit IL-2_dEx5 | CCCAAAGAAGTTTTCATGCTGCCCATCCAGGTCCAGGCCCGCCCCCTGA | 578 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5 | CCCAAAGAAGTTTTCATGCTGCCCATCCAGGTCCAGGCCCGCCCCCTGA | 578 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ | -----TTTTCATGCTGCCCATCCAGGTCCAGGCCCGCCCCCTGA | 482 |
| NKL-ohne IL-2_volle Länge | CCCAAAGAAGTTTTCATGCTGCCCATCCAGGTCCAGGCCCGCCCCCTGA | 862 |
| | ***** | |

Exon 9

| | | |
|---------------------------|--|------|
| referenz Sequenz | GGACTCAGACTCTGGCTCGGACTCAGACTATGAGCACTATGACTTCAGCG | 1700 |
| NKL-mit IL-2_volle Länge | GGACTCAGACTCTGGCTCGGACTCAGACTATGAGCACTATGACTTCAGCG | 912 |
| NKL-mit IL-2_dEx8 | GGACTCAGACTCTGGCTCGGACTCAGACTATGAGCACTATGACTTCAGCG | 816 |
| NKL-mit IL-2_dEx5 | GGACTCAGACTCTGGCTCGGACTCAGACTATGAGCACTATGACTTCAGCG | 628 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5 | GGACTCAGACTCTGGCTCGGACTCAGACTATGAGCACTATGACTTCAGCG | 628 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ | GGACTCAGACTCTGGCTCGGACTCAGACTATGAGCACTATGACTTCAGCG | 532 |
| NKL-ohne IL-2_volle Länge | GGACTCAGACTCTGGCTCGGACTCAGACTATGAGCACTATGACTTCAGCG | 912 |
| | ***** | |

| | | |
|---------------------------|--|------|
| referenz Sequenz | CCCAGCCTCCTGTGGCCCTGACCACCTTCTACAATTCCCAGCGGCATCGG | 1750 |
| NKL-mit IL-2_volle Länge | CCCAGCCTCCTGTGGCCCTGACCACCTTCTACAATTCCCAGCGGCATCGG | 962 |
| NKL-mit IL-2_dEx8 | CCCAGCCTCCTGTGGCCCTGACCACCTTCTACAATTCCCAGCGGCATCGG | 866 |
| NKL-mit IL-2_dEx5 | CCCAGCCTCCTGTGGCCCTGACCACCTTCTACAATTCCCAGCGGCATCGG | 678 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5 | CCCAGCCTCCTGTGGCCCTGACCACCTTCTACAATTCCCAGCGGCATCGG | 678 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ | CCCAGCCTCCTGTGGCCCTGACCACCTTCTACAATTCCCAGCGGCATCGG | 582 |
| NKL-ohne IL-2_volle Länge | CCCAGCCTCCTGTGGCCCTGACCACCTTCTACAATTCCCAGCGGCATCGG | 962 |
| | ***** | |

Exon 10

| | | |
|---------------------------|---|------|
| referenz Sequenz | GTCACAGATGAGGAGGTCCAGCAAAGCAGGTTCCAGATGCCACCCTTGA | 1800 |
| NKL-mit IL-2_volle Länge | GTCACAGAT----- | 971 |
| NKL-mit IL-2_dEx8 | GTCACAGAT----- | 875 |
| NKL-mit IL-2_dEx5 | GTCACAGATGAGGAGGTCCAGCAAAGC----- | 705 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5 | GTCACAGATGAGGAGGTCCAGCAAAGC----- | 705 |
| NKL-ohne IL-2_dEx5+8_ | GTCACAGATGAGGAGGTCCAGCAAAGC----- | 609 |
| NKL-ohne IL-2_volle Länge | GTCACAGAT----- | 971 |
| | ***** | |

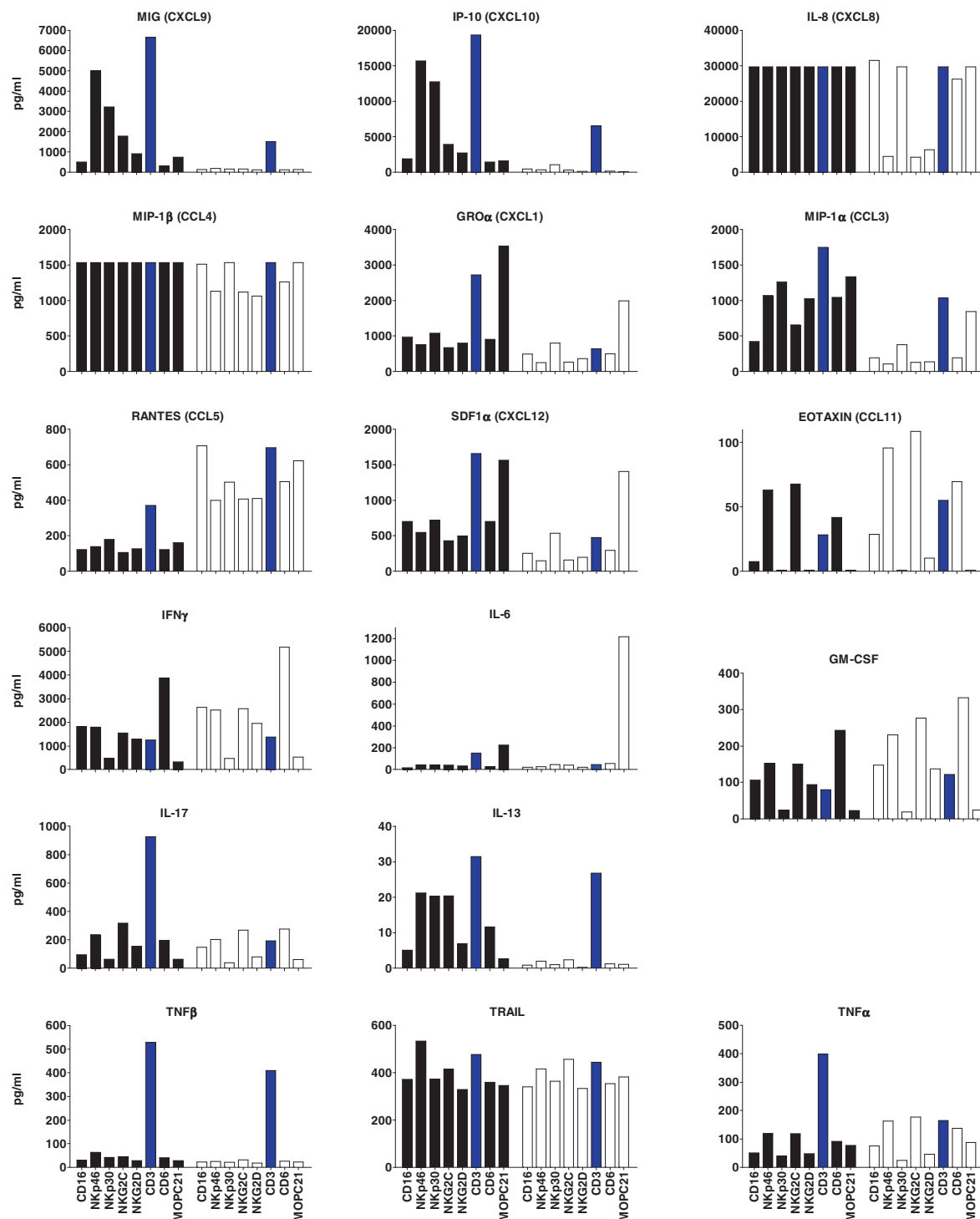


Abbildung 38: Vergleich der Chemokin- und Zytokinproduktion von PBMC und SFMC eines Patienten mit Arthritis nach Stimulation verschiedener Rezeptoren.

PBMC (weiße Balken) und SFMC (schwarze Balken) eines Patienten mit rheumatoide Arthritis (RA) wurden mit 10 µg/ml plattengekoppelten Antikörpern gegen CD16, NKp46, NKp30, NKG2C, NKG2D, CD3, CD6 und MOPC21 (Isotypkontrolle) stimuliert. Die Stimulation von PBMC oder SFMC eines Patienten mit Arthritis erfolgte in Anwesenheit von 100 U/ml IL-2. Nach 50 Stunden wurde die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen im Zellkulturüberstand mit Hilfe der Multiplex Technologie quantifiziert (pg/ml). Gezeigt ist eines von drei repräsentativen Experimenten. Blau hervorgehoben sind die Werte nach Stimulation mit CD3.

C. Danksagung

Zuerst möchte ich mich von ganzem Herzen bei dir liebe Chris für mein Thema und die letzten Jahre bedanken! Als ich damals zu dir gekommen bin, hätte ich nie gedacht, dass Forschung so viel Spaß machen kann. Danke für dein Vertrauen, deine ansteckende Begeisterung und deine außergewöhnliche Unterstützung, die es mir erlaubt hat, einen umfassenden Blick in die Wissenschaft zu erhalten.

Mein weiterer Dank gilt meinen „alten“ Kollegen....

Barb, für die super Einarbeitung und für den „Ich lerne noch“ Button. Meinem Ex-Schreibtischnachbar, Dr. Mason, für überragend lustige Stunden im Labor (wie ist der Song-Quiz-Punktstand?). Moni, für die vielen wertvollen fachlichen und privaten Gespräche. Christian und Susan, für eure Hilfe und Unterstützung. Tina und Luditchka, für eure Hilfe und die lustige, warmherzige Atmosphäre im Labor.

....und meinen „neuen“ Kollegen:

Christine, für deine aufbauenden Worte, deine Freundschaft und deine super Korrekturen. Jana, Ali, Maja, Kerstin, Susanne und Sigrun für eure Unterstützung und den Aufbau eines neuen ebenso coolen Falk-Labors.

Besonders möchte ich David danken. Ich möchte mir nicht vorstellen, wie die Zeit des Schreibens ohne dich ausgesehen hätte. Danke für deine großartige Unterstützung und dass du es immer wieder geschafft hast, mich zum Lachen zu bringen.

Nicht vergessen darf ich Nina und Felix, die mit meiner Nacht und Nebel-Aktion nun doch einen Platz in meiner Danksagung verdient haben.

Zuletzt möchte ich mich bei Anke, Karin und Ewald bedanken. Ihr habt mich so viele Jahre unterstützt und nie den Glauben an mich verloren. Wenn jemandem diese Arbeit gewidmet werden soll, dann euch!

**Erklärungen
gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, 29.05.2012
